

17.12.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 2 4 日
Date of Application:

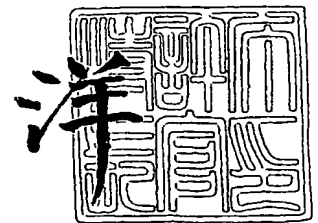
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 6 4 6 8 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 3 6 4 6 8 2]

出 願 人 日 本 た ば こ 産 業 株 式 有 限 公 司
Applicant(s):

2 0 0 5 年 2 月 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出 証 番 号 出 証 特 2 0 0 5 - 3 0 0 6 2 2 1

【書類名】 特許願
【整理番号】 031959
【提出日】 平成15年10月24日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12N
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社
植物イノベーションセンター内
【氏名】 久保 友明
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社
植物イノベーションセンター内
【氏名】 小鞠 敏彦
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社
植物イノベーションセンター内
【氏名】 宇佐美 悟
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社
植物イノベーションセンター内
【氏名】 高倉 由光
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社
植物イノベーションセンター内
【氏名】 樋江井 祐弘
【発明者】
【住所又は居所】 静岡県磐田郡豊田町東原 7 0 0 番地 日本たばこ産業株式会社
植物イノベーションセンター内
【氏名】 石田 祐二
【特許出願人】
【識別番号】 000004569
【氏名又は名称】 日本たばこ産業株式会社
【代理人】
【識別番号】 100089705
【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2 0 6 区
ユアサハラ法律特許事務所
【弁理士】
【氏名又は名称】 社本 一夫
【電話番号】 03-3270-6641
【ファクシミリ番号】 03-3246-0233
【選任した代理人】
【識別番号】 100076691
【弁理士】
【氏名又は名称】 増井 忠次
【選任した代理人】
【識別番号】 100075270
【弁理士】
【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】
【識別番号】 100080137
【弁理士】
【氏名又は名称】 千葉 昭男
【選任した代理人】
【識別番号】 100096013
【弁理士】
【氏名又は名称】 富田 博行
【選任した代理人】
【識別番号】 100092886
【弁理士】
【氏名又は名称】 村上 清
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 051806
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0302083

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

以下の工程を含むことを特徴とする、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片の選抜方法:

- (1) 植物からゲノムDNAを調製し、クローニングベクターを用いて、ゲノムDNAライブラリーを構築する;
- (2) ゲノムDNAライブラリーを構成する複数のゲノムクローンの各々に含まれるゲノム断片を、個別に植物に導入し、形質転換植物を作出する;
- (3) 形質転換植物、または、その子孫の植物を栽培し、表現型に農業上有益となりうる変異の生じた植物を選抜する;
- (4) 工程(3)において選抜された植物に、工程(2)において導入されていたゲノムDNA断片を、目的とするゲノムDNA断片として選抜する;
- (5) 場合により、工程(4)で選抜されたゲノムDNA断片の全部または一部を植物に導入して、工程(3)および(4)を繰返し、各繰返しの度に表現型に農業上有益となりうる変異の生じた植物を与えたゲノムDNA断片を、目的とするゲノムDNA断片として選抜する。

【請求項 2】

選択されるゲノムDNA断片のサイズが、クローニングベクターに導入可能な大きさの範囲で、1kb以上である請求項1の方法。

【請求項 3】

工程(2)が、植物細胞もしくは組織のゲノムへのゲノム断片の導入、該植物細胞のカルス化、該カルスからの植物体への再生、再生した植物の栽培、の各工程を含む、請求項1または2の選抜方法。

【請求項 4】

植物細胞もしくは組織のゲノムへのゲノムDNA断片の導入が、生物的導入法、物理的導入法、化学的導入法からなる群から選択される方法により行われる、請求項3の選抜方法。

【請求項 5】

植物に農業上有益となりうる変異が、通常の栽培条件下で植物体およびその含有成分の少なくとも一部について、変異がない植物に比べて量的な増大または減少、または、その生長速度の増大をもたらす変異、または病虫害抵抗性をもたらす変異である、請求項1～4のいずれか1項の選抜方法。

【請求項 6】

植物に農業上有益となりうる変異が、通常より植物にストレスが付加される栽培条件下で植物体およびその含有成分の少なくとも一部について、変異がない植物に比べて量的な増大または減少、または、その生長速度の増大をもたらす変異、または病虫害抵抗性をもたらす変異である、請求項1～4のいずれか1項の選抜方法。

【請求項 7】

工程(2)で形質転換される植物が、工程(1)でゲノムDNAの供給源とされた植物と同じ種の植物である、請求項5または6の選抜方法。

【請求項 8】

工程(2)で形質転換される植物が、工程(1)でゲノムDNAの供給源とされた植物と異なる種の植物である、請求項5または6の選抜方法。

【請求項 9】

場合により工程(5)でゲノムDNA断片を導入する植物が、工程(2)で形質転換された植物と同じ種の植物である請求項7または8の選抜方法。

【請求項 10】

場合により工程(5)でゲノムDNA断片を導入する植物が、工程(2)で形質転換された植物と異なる種の植物である請求項7または8の選抜方法。

【請求項 11】

場合により工程(5)でゲノムDNA断片を導入する植物が、工程(2)で形質転換された植

物と同じ栽培条件下で栽培される請求項 9 または 10 の選抜方法。

【請求項 12】

場合により工程 (5) でゲノムDNA断片を導入する植物が、工程 (2) で形質転換された植物と異なる栽培条件下で栽培される請求項 9 または 10 の選抜方法。

【請求項 13】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法により選抜されたゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを含む大腸菌を培養する工程および、大腸菌中で増幅したゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを調製する工程を含むことを特徴とする、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片の製造方法。

【請求項 14】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を鋳型として、生化学的増殖法による増殖を行うことを特徴とするゲノムDNA断片の製造方法。

【請求項 15】

請求項 13 または 14 の方法によって製造されたゲノムDNA断片を制限分解する工程を含むDNA断片の製造方法。

【請求項 16】

請求項 13～15 のいずれか 1 項の方法により製造されたDNA断片。

【請求項 17】

請求項 1～16 のいずれか 1 項の方法により選抜または製造されたゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを含む大腸菌を培養する工程および、大腸菌中で増幅したゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを調製する工程を含むことを特徴とする方法で製造した、農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を、植物に導入する工程を含む、農業上有益となりうる変異を有する植物の製造方法。

【請求項 18】

農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を、植物に導入する工程が、植物細胞もしくは組織へのゲノム断片の導入、該植物細胞のカルス化、該カルスからの植物体への再生、再生した植物の栽培、の各工程を含む、請求項 17 の農業上有益となりうる変異を有する植物の製造方法。

【請求項 19】

植物細胞もしくは組織へのゲノムDNA断片の導入が、生物的導入法、物理的導入法、化学的導入法からなる群から選択される方法により行われる、請求項 18 の植物の製造方法。

【請求項 20】

農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を導入する植物が、該ゲノムDNA断片が由来する植物と同じ種の植物である、請求項 17～19 のいずれか 1 項の植物の製造方法。

【請求項 21】

農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を導入する植物が、該ゲノムDNA断片が由来する植物と異なる種の植物である、請求項 17～19 のいずれか 1 項の植物の製造方法。

【請求項 22】

請求項 17～21 のいずれか 1 項の方法により製造した植物。

【請求項 23】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法により選抜されたゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを含む大腸菌を培養する工程および、大腸菌中で増幅したゲノムDNA断片を含むクローニングベクターを調製し、クローニングベクター中の植物ゲノムDNA断片のヌクレオチド配列を解読する工程を含むことを特徴とする、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片の分析方法。

【請求項 24】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を制限分解す

る工程を含むDNA断片の分析方法。

【請求項 25】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を鋳型として、生化学的増殖法による増殖を行うことを特徴とするDNA断片の分析方法。

【請求項 26】

分析が、ゲノムDNA断片の制限分解産物または生化学的増殖法による増殖産物のヌクレオチド配列を解読する工程を含む、請求項 24 または 25 の分析方法。

【請求項 27】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を、植物の品種改良におけるマーカーとして使用する方法。

【請求項 28】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片をマーカーとし、該マーカーをゲノムDNA中に有する植物個体は品種改良に適すると判断し、該マーカーを有しない植物個体は品種改良に不適であると判断することからなる、請求項 27 の方法。

【請求項 29】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を有することが知られている植物と、品種改良をすべき植物とを掛け合わせて得られた、後代植物個体からゲノムDNAを調製し、前記ゲノムDNA断片を有する後代植物個体を、品種改良のさらなる工程に使用できると判断することからなる、請求項 28 の方法。

【請求項 30】

請求項 1～12 のいずれか 1 項の方法によって選抜されたゲノムDNA断片を有することが知られている植物が、請求項 22 の植物である、請求項 29 の方法。

【書類名】明細書

【発明の名称】ゲノムDNA断片の選抜方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を効率良く選抜する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

農業上有益な新品種を育成するため、従来から、植物同士を交配させて後代を選抜する交配育種法や、植物に突然変異を誘発させる突然変異育種法などが行われてきた。また近年では、バイオテクノロジーの進歩により、有用遺伝子を導入しその機能を発現させる遺伝子組換え植物も育成されている。

【0003】

個別遺伝子導入による新品種育成

通常、遺伝子組換えにより新品種を育成するためには、まず遺伝子を単離し、その機能を解析する必要がある。植物遺伝子についての分子生物学的知見は、近年飛躍的に増大しており、多くの種のゲノムDNA配列が決定され、部分長鎖および全長鎖cDNAクローンも多数単離され、その配列も決定されている。但し、これまでにクローン化され、推定されている遺伝子機能の多くは、単に、遺伝子のコード領域の塩基配列またはそれから推定される蛋白質のアミノ酸配列が、従来発見されている酵素遺伝子などの配列と類似であるとの情報に基づいており、遺伝子の機能を検証するには、形質転換体において遺伝子の発現と表現型とが一致することを確認しなければならない。そのため、個々の遺伝子の機能解明には大変な時間と労力が必要となり、その解明はほとんど進んでいない。

【0004】

全長鎖cDNAクローンを単離し、これを適当なプロモーター、ターミネーターと連結し、形質転換することにより、遺伝子の機能を検証しようとする試みがある。またこれを進めて、完全長cDNAのライブラリーを植物に導入して、遺伝子機能を網羅的に解析する技術も開発されている(WO 03/018808 A)。しかし、これらにおいては、その遺伝子が本来持つプロモーターでなく、さらにイントロンその他の遺伝子発現制御機能も除かれてしまっているため、遺伝子本来の機能を発現することは期待しにくい。また、遺伝子によっては、そのスプライシングの方法が一通りではないために(Jordan et al. Trends in Plant Sciences 17:392-398, 2002)、cDNAクローンから本来の機能が失われている場合もある。実際、形質転換植物に認められる変異は、その多くが奇形であり、新品種育成の実用性には乏しい。

【0005】

近年ではバイオインフォマティックスの手法を利用し、各遺伝子のタンパク質に翻訳されるコーディング領域、プロモーター領域、イントロン領域などの推定も行われている。DNA断片を用いたマイクロアレイ技術により、遺伝子の発現様式が調査されている。遺伝子ノックアウト技術により、機能欠失変異体が数多く作製されており、遺伝子機能解析に使われている。また、アクチベーションタギングにより、遺伝子発現を高進した形質変換体が作製され、遺伝子機能解析に使われている。遺伝子によりコードされるタンパク質相互間の関係を明らかにするために、トゥーハイブリッドシステムが用いられている。

【0006】

しかし、バイオインフォマティックスによる遺伝子機能の推定では、既知のタンパク質の機能や構造と、それをコードする遺伝子の配列との関係から得られた知見を、機能不明の遺伝子の機能探索に利用するケースが多いが、最近の研究によって、cDNAの中には、タンパク質に翻訳されないものが多く存在すること、すなわち、mRNA様のRNAが転写はされるもののタンパク質は生成されない遺伝子が、多く存在することが明らかとなった。また、転写後、低分子のRNAとして機能する遺伝子も多い。したがって、これまでのバイオインフォマティックスの技術では、機能解明が困難なゲノムDNA上の遺伝子も多い。そのため

、このような最新の手法を駆使しても、遺伝子機能の推定は容易ではない。

【0007】

上記のように遺伝子機能の解析は現在でも容易ではない。そして、たとえ遺伝子機能が特定できたとしても、このような個別遺伝子の形質転換を行う方法では、いわゆるヘテロシスにおいて発現の向上が認められる形質や量的形質を向上させた新品種を育成することは困難である。

【0008】

ヘテロシス

ヘテロシス（雑種強勢）とは、2つの親品種を交雑したときに、雑種第一代（F1）が両親より強い生活力を示す現象をいう。ヘテロシスにおいては、植物体全体のビガー(vigor)が高い、植物体および器官が大きい、収量が高い、生長速度が速い、病害・虫害に強い、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対して強い、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減等々、さまざまな形質の向上が認められるが、これらの形質には農業上極めて有益なものが多い。ヘテロシスを用いた育種法として、異なる親を掛け合わせて新品種を作出する一代雑種育種法が古くから栽培植物の改良に利用されており、トウモロコシを始め、多くの作物において優良品種育成に大きな貢献をしてきた。しかし一代雑種育種法は、育種集団の育成・改良、自殖系統の育成、一般組合せ能力検定、特定組合せ能力検定、F1品種の選出等々の、多数のステップを必要とし、さらに、それぞれのステップには多大な時間と労力が必要となる。また、ヘテロシスは遺伝的に遠縁の親同士の間掛け合わせで大きな効果が認められることが多いが、その反面、類縁関係が遠い場合、交配しても稔性をもたないことも多く、交配を行うことができる種の範囲は限られたものであった。

【0009】

ヘテロシスを起こす分子機構は未だ解明されていない。最近の育種学の教科書においても、「生理学的、生化学的および分子レベルでの（ヘテロシス）の原因因子は、今日でも1952年に開かれたヘテロシス会議の当時と同じく、殆ど知られていない」(Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops, p.173, ed. Coors and Pandey, 1999, American Society of Agronomy, Inc. and Crop Science Society of America, Inc., Madison, WI, U. S. A.)と記載されている。

【0010】

最近、トウモロコシに関してヘテロシスに関連する興味深い報告がなされた。Fu and Dooner, Proc. Natl Acad Sci USA 99:9573-9578, 2002とSong and Messing, Proc Natl Acad Sci USA 100:9055-9060, 2003である。両報とも、トウモロコシの特定の遺伝子座に着目して品種間の塩基配列の差異を調査し、その結果トウモロコシにおいては、品種間差異が、イネなどの自殖性作物の場合と比べ相当に大きいことが示された。

【0011】

これらの知見は、ヘテロシスの現れやすい他殖性のトウモロコシでは、自殖性の作物よりも、品種間のゲノムDNAの配列の差異が大きいことを示す興味深いものであるが、ヘテロシスを起こす分子機構が解明されたといえるものではない。

【0012】

このようにヘテロシスを起こす分子レベルでの機構については未だ解明されていない。しかし、マクロなレベルでは、以下に示すような各種の遺伝子の相互作用により、ヘテロシスが起こることが明らかになってきている。

【0013】

イ) 優性遺伝子連鎖効果(dominance effect)

ヘテロシスの認められる形質は、種々の連鎖群にある多くの遺伝子座に支配され、各遺伝子座において、生存や生産力に有利な対立遺伝子(allele)は優性で、不利な対立遺伝子は劣性である場合が多いと考えられる。連鎖している遺伝子座が多いため、多数の遺伝子座のすべてにおいて、有利な対立遺伝子がホモとなる系統を得ることは不可能に近い。しかし、F1においては、両親の持つすべての有利な対立遺伝子を合わせもつことができるため、ヘテロシスが引き起こされる。

【0014】

ロ) 超優性効果(over-dominance effect)
多数の遺伝子座において、それぞれ2つの対立遺伝子がヘテロに存在する場合の方が、どちらかの対立遺伝子がホモに存在する場合よりも、生存や生産力に有利な場合があり、このような効果の総和によりヘテロシスがもたらされる。

【0015】

ハ) 非対立遺伝子相互作用(interaction of non-allelic genes)
生存や生産力に有利な形質が、F1雑種において、異なった遺伝子間の相乗的な効果としてもたらされる場合がある。このような性質を示す多数の遺伝子の効果の総和が、ヘテロシスをもたらす。

【0016】

ニ) 細胞質遺伝子の効果(interaction between nuclear genes and cytoplasmic genes)
核遺伝子と細胞質遺伝子の相互作用により、F1雑種において、生存や生産力に有利な形質が発現する場合がある。

【0017】

これらの各種、複数の遺伝子の相互作用により、ヘテロシスが引き起こされると考えられている。Stuber (Plant Breeding Reviews 12:227-251, 1994)は、これらのそれぞれが実際に関与していることを示す多数の文献を紹介しており、ヘテロシスは、多数の遺伝因子によって支配されていることを強調している。また、Li and Yuan (Plant Breeding Reviews 17:15-158, 2000)も、上記のさまざまな効果の総和によってヘテロシスが起こると考えている。

【0018】

このようにヘテロシスは、多数の遺伝因子によって支配されているため、個別遺伝子の形質転換のみでは、ヘテロシスにおいて発現の向上が認められる形質を向上させた新品種を育成することは困難である。

【0019】

量的形質

ヘテロシスにより発現の向上が認められる形質は、いわゆる量的形質であることが多いが、これを支配する量的形質遺伝子座(QTL, Quantitative Trait Loci)については、その遺伝解析は簡単ではない。しかし、近年の分子生物学的手法の発展とともに、DNAマーカーを用いてQTLの遺伝解析を行うことが可能となってきた。実際、ある量的形質を支配するQTLを含む染色体部位が特定された例もある。さらに遺伝子地図を利用し、分子生物学的手法により、農業上有用な遺伝子をクローニングする研究も盛んになっている。

【0020】

一部の生物では、染色体上に多くの分子マーカーが同定され、マーカーの連鎖分析に基づいた遺伝子地図が作成されている。また、長大なゲノムDNAを連結することにより、物理的な位置関係も明らかになっている。

【0021】

遺伝子地図が作成されている生物では、特定の表現型をしめす形質とマーカーとの連鎖分析、および、それに続く染色体歩行などにより、その形質を支配する遺伝子の物理的位置を明らかにし、遺伝子を単離する試みが行われている。実際、この手法(マップベースクローニング)により、いくつかの遺伝子が単離されている。

【0022】

しかし、通常のQTL解析では、QTLを含む部位の同定は大まかにしかできず、理論的に多数の遺伝子を含むDNA断片が、QTLを含むDNA断片として明らかになるに過ぎない。そしてクローニング可能な大きさの断片、あるいは、形質転換により植物に導入することが可能な大きさの断片として同定することは容易ではない。また、詳細な遺伝子地図を作成して地図情報をもとに求める遺伝子を特定し、遺伝子をクローニングする作業には、長い時間と多くの労力が必要となる。実際に、QTL解析をもとに、量的形質を増大させるDNA断片が

クローニングされた例はほとんどない。

【0023】

ゲノムDNAライブラリー作出と、ゲノム断片による形質転換技術

植物由来のゲノム断片のライブラリーを構築する技術は公知である。その際に形質転換可能なベクターを用いることも公知である。植物由来の個々の特定のクローンとしてのゲノム断片を、高等植物に導入する実験も試みられてきた。しかし、ゲノムDNAライブラリーを構成する、機能が未知の、多数のゲノム断片を個別に植物に導入する試みはこれまでになされていない。

【0024】

また、ゲノムクローンを利用した場合に、cDNAを利用する場合と比べ遺伝子の発現効率が高くなる場合があることも知られている。実際、ある遺伝子（トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼPhosphoenolpyruvate carboxylase）を含むゲノム断片を、植物（イネ）に導入したところ、極めて高いレベルで外来遺伝子の発現が認められたことも報告されている（Ku et al. Nature Biotechnol. 17:76-80, 1999）。また、40 - 80 kbのアラビドプシス由来のゲノムクローン3個を、個別にアラビドプシスに導入した実験例が報告されている（Liu et al. Proc Natl Acad Sci USA 96:6535-6540, 1999, Shibata and Liu Trends in Plant Sci 5:354-357, 2000）。うち2個のクローンは、これらのクローンに含まれている遺伝子座に突然変異を起こし重力屈性を失ったアラビドプシス系統に導入され、欠失していた重力屈性が相補されることが確認されている。

【0025】

上記の知見は、生物の遺伝子、とりわけ、多細胞生物の遺伝子は、時間的、空間的な分布、および、外的刺激などの環境条件により、その発現量が複雑な制御を受けていること、即ち、何時、どの組織、細胞で、どんな時に、どの程度の発現をするかが、その遺伝子の重要性を決定していることを示唆する。即ち、これらの高度な遺伝子制御を含んだ機能を解明するためには、その遺伝子のゲノム断片に含まれている、プロモーター、イントロン、エンハンサー、構造遺伝子、スプライシング部位、その他の高度な遺伝子発現制御機能のすべてを明らかにしなければならない。しかし、この作業には多大な労力と時間が必要であり、多くの遺伝因子の相互作用を解明するのは困難である。

【0026】

【特許文献1】PCT国際公開WO 03/018808 A

【非特許文献1】Jordan et al. Trends in Plant Sciences 17:392-398, 2002

【非特許文献2】Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops, p.173, ed. Coors and Pandey, 1999, American Society of Agronomy, Inc. and Crop Science Society of America, Inc., Madison, WI, U. S. A.

【非特許文献3】Fu and Dooner, Proc. Natl Acad Sci USA 99:9573-9578, 2002

【非特許文献4】Song and Messing, Proc Natl Acad Sci USA 100:9055-9060, 2003

【非特許文献5】Stuber, Plant Breeding Reviews 12:227-251, 1994

【非特許文献6】Li and Yuan, Plant Breeding Reviews 17:15-158, 2000

【非特許文献7】Ku et al. Nature Biotechnol. 17:76-80, 1999

【非特許文献8】Liu et al. Proc Natl Acad Sci USA 96:6535-6540, 1999

【非特許文献9】Shibata and Liu Trends in Plant Sci 5:354-357, 2000

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0027】

本発明は、農業上有益な変異をもたらすことのできる、多数のゲノムDNA断片を効率良く選抜し、クローン化されたDNA断片として選抜し、調製する方法を提供する。

本発明は、複数の遺伝因子により発現が向上する形質について、その発現を向上させるゲノムDNA断片を効率良く選抜、調製する方法を提供する。

【0028】

本発明は、ヘテロシスにおいて発現が認められる形質や量的形質を向上させることので

きる、多数のゲノムDNA断片を効率良く選抜し、クローン化されたDNA断片として選抜し、調製する方法を提供する。

【0029】

本発明は、一代雑種育種法などの手法で避けることができない、育種集団の育成・改良、自殖系統の育成、一般組合せ能力検定、特定組合せ能力検定、F1品種の選出等々の、各々が長期の時間を要する多数のステップを必要とせずに、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を効率良く選抜、調製する方法を提供する。

【0030】

本発明は、形質発現の機構や、形質を発現させる個々の遺伝子に関する情報がほとんどない場合でも、表現型のみに基づいて優良個体を選抜して、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片を効率良く選抜、調製する方法を提供する。

【0031】

本発明は、同種の植物品種間のみならず異種の植物品種間でも、ヘテロシスで見られる形質向上と同様の発現（以下「ヘテロシス様発現」という。）を可能にするゲノムDNA断片を効率良く選抜、調製する方法を提供する。

【0032】

本発明は、多大な時間と人手を要することなく、ヘテロシス様発現を可能にする多数のゲノムDNA断片を短期間に効率よく選抜、調製する方法を提供する。

本発明は、本発明の方法で調製した、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片もしくはヘテロシス様発現を引き起こすことができるゲノムDNA断片で植物を形質転換することにより、農業上有益となりうる変異を有する植物を製造する方法、並びに該方法で製造した植物を提供する。

【0033】

本発明は、本発明の方法で調製した、植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片もしくはヘテロシス様発現を引き起こすことができるゲノムDNA断片の全部またはその一部をマーカーとして使用し、農業上有益となりうる変異を有する植物を育成する方法、並びに該方法で育成した植物を提供する。

【用語の説明】

【0034】

本明細書において、「農業上有益な変異」とは、「植物にとって通常もしくは良好な栽培条件または植物に何らかのストレスのかかる条件下で、植物、特に栽培植物および／または観賞用植物において、植物体の少なくとも一部について、量的な増大または減少、または、その生長速度の増大または減少をもたらす変異」である。ストレスのかかる条件とは、栽培地の塩濃度、高温、低温、乾燥、病害等を含む。

【0035】

このような変異は、通常の栽培条件下で、子実・茎葉等が増大すれば、多収という形質になるし、病害ストレス等がおよぶ条件下で枯死せず、対照と比して子実・茎葉等が増大していれば、病害ストレス等に対する抵抗性を意味するからである。内容成分や、植物体に含まれる酵素等も、当然、「植物体の一部」に包含される。植物体の全体または部分のサイズの減少も、矮性植物の育種が盛んに行われ、広く栽培されていることから、農業上有益である場合がしばしばある。

【0036】

よって、「何らかの栽培条件下で、植物体の少なくとも一部について、量的な増大または減少、または、その生長速度の増をもたらす変異」という概念は、植物体全体のビガー(vigor)が高い、植物体および器官が大きい、収量が高い、生長速度が速い、病害・虫害に強い、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対して強い、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、矮性化、等々、農業上有益な多くの変異を包含する。

【0037】

[課題を解決するための手段]

本発明は、以下の(1)ないし(4)および所望により(5)の工程により、植物に農業上

益となりうる変異をもたらすことができる、ゲノムDNA断片を選抜する方法である。

(1) まず、植物から、通常用いられている方法によりゲノムDNA断片を単離し、部分的に制限分解を行い、サイズ分画の後、常法によりゲノムDNAライブラリーを構築する。

【0038】

ゲノムDNA断片を供与する植物には特別の制限はないが、好ましい例として、ゲノムDNA断片の導入先植物との交配によって、ヘテロシスが生じうる植物があげられる。例えば、導入先の植物がジャポニカイネである場合は、野生イネの一種であるオリザ・ルフィポゴンや、インディカイネが好ましい。導入先の植物がトウモロコシの特定品種である場合は、トウモロコシの他の品種や、野生種のテオシントなどが好ましい供与元植物の例である。一般的に、類縁関係の遠い植物ほど大きなヘテロシスが観察されている。従来は類縁関係が遠い場合には、交配が不可能となるため、類縁関係の遠い植物との組み合わせによるヘテロシスを利用できなかったのに対し、本発明の方法では、交配ができない供与元植物のゲノムDNA断片を容易に利用できるため、類縁関係の遠い植物も好ましい供与元植物として利用可能である。

【0039】

ゲノムライブラリーの構築に用いるクローニングベクターとしては、種々のベクターが利用できる。好ましくは、直接、導入先の植物の形質転換に用いることのできるベクターが用いられる。例えば、イネ、タバコ、アラビドプシス等を形質転換するためにはpSB200やpCLD04541 (Tao and Zhang Nucleic Acid Res 26:4901-4909, 1998) が使用でき、トウモロコシを形質転換するためにはpSB25UNpHmが使用できる。

【0040】

クローニングするDNA断片は、ゲノム中に存在する個々の遺伝子とその発現制御に必要な領域が内包できるよう、少なくとも1 kb以上であり、10 kb以上の大きさが好ましく、さらに好ましくは20 kb以上、さらに好ましくは30~40 kb以上である。いずれにせよ、DNA断片の大きさにはクローニングベクターに導入できる限り特別の上限はない。このようなDNA断片サイズを得るための部分的制限分解の方法は公知である。ゲノムDNAライブラリーを構成するクローンの総数、すなわち、ライブラリーのサイズは、植物ゲノムの多くの遺伝子が含まれるよう十分に大きいことが好ましい。部分的制限分解に用いる酵素としては、さまざまなものを用いることができる。より偏りの少ない分解を行うためには、4塩基認識の制限酵素、例えば、MboI、TaqIなどの使用が望ましい。適当な分解条件を決定する方法は公知であり、例えば、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. に詳細な記載がある。

【0041】

理論的には、任意のゲノム断片が当該ゲノムDNAライブラリーにある確率で含まれるための、クローンの総数は下記の式により計算される。

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$$

(式中、

Pは、任意のゲノム断片が当該ゲノムDNAライブラリーに含まれる確率であり、
fは、クローンに含まれるゲノム断片の平均長/元の植物のゲノムサイズであり、
Nは、ゲノムクローンの総数である)。

【0042】

例えば、イネ由来のゲノムDNAライブラリーの場合、任意のゲノム断片が当該ゲノムDNAライブラリーに含まれる確率を70%、ゲノムDNAライブラリーの平均断片長を40 kbとすると、

$$N = \ln(1-0.7) / \ln[1 - (40 \times 10^3 / 430 \times 10^6)] = 1.3 \times 10^4$$

となり1万3千個のクローンが必要となる。

【0043】

個々のクローンに含まれるゲノム断片サイズが大きい場合には、より少数のゲノム断片数を調査すれば、求めるゲノム断片を獲得することができる。一方、ゲノム断片サイズが

小さい場合には、その後のクローニング操作等の取扱いが容易になり、また、形質転換によって植物に導入する効率も高くなる。扱う植物のゲノムサイズ、実験の規模等の要因は総合的に検討して、決定される。

【0044】

ゲノムサイズの大きな植物を取り扱う場合には、メチル化されたDNA断片を排除することによって、発現する遺伝子の内包されるDNA断片の頻度を向上させる手法の利用も有用である。ゲノムサイズの大きな植物には、遺伝子としては機能しない不要なDNAが多く含まれていると考えられており、そのようなDNAはメチル化されていることが多いと言われる。メチル化されているDNAを生化学的に除去する方法は公知であるし、クローニングの際に、メチル化されたDNAを除去する性質を持った大腸菌を用いることによって、メチル化されたDNAの除去が可能である (WO 00/50587)。

【0045】

ゲノムDNAライブラリーの構築後、ライブラリーを構成するクローンの一部を、大腸菌に取り込ませて培養する。出現するコロニー数 (プラスミドまたはコスミドベクターの場合) やプラーク数 (ファージベクターの場合) を計数し、これを元に、ライブラリーに含まれるクローンの総数を見積もる。さらに、出現したコロニーやファージの一部から、DNAを調製し、クローン化されたDNA断片の大きさを計測し、平均の断片長を見積もる。

【0046】

(2) ライブラリーを構成する個々のクローンに含まれるゲノム由来のDNAを、個別に植物に導入する。

直接、植物の形質転換に用いることのできるベクター、例えばpSB200、pCLD04541、pSB25UNpHm等のベクターを用いた場合には、個々のクローンをそのまま、形質転換実験に用いることができる。そうでない場合には、個々のクローンに含まれるDNA断片の全部または一部を、形質転換用ベクターに移す操作を行った後、形質転換実験を行うことができる。

【0047】

形質転換に用いる導入先植物は、ゲノムDNAの由来する植物とは異種の植物であってもよく、同種の異なる品種であってもよく、同種の同一の品種であってもよい。好ましい植物の例として、イネ、大麦、小麦、トウモロコシなどの穀物、コーヒー、ココア、茶、タバコ、等の嗜好品を製造するための植物、野菜類、果物類、花などの観賞用植物、など実質上制限無く広い範囲の植物があげられる。

【0048】

形質転換の方法は、既存のどのような方法であってもよい。例えば、生物的導入法としてアグロバクテリウム法などが、物理的導入法としてマイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法、シリコンカーバイド法、エアースインジェクション法などが、化学的導入法としてポリエチレングリコール法などが知られている。形質転換によりゲノムDNAは導入先植物のゲノムに組み込まれる。

【0049】

本発明によれば、一つの植物ゲノムライブラリーから得られる、ヘテロシス様発現を引き起しうるゲノムDNA断片は、一つに限られないことが分かった。そこで、より多くのゲノム断片を選抜するためには、より多くのゲノム断片を、個別に植物に導入することが望ましい。また、本発明の選抜方法では、何らかの予備的な選抜工程を含めることを妨げないが、選抜される候補断片の偏りを排するためには、植物へ導入するゲノムDNA断片は、該導入以前に、できるかぎり予備的な選抜工程を含めないことが望ましい。

【0050】

また、植物に導入する各ゲノムクローンについては、その少なくとも一部を増幅および/または保管しておく。保管は通常の方法により行ってよく、純化されたDNA、または、ゲノムクローンを含む大腸菌等の細菌、酵母等として保管される。

【0051】

(3) ゲノム断片が導入された形質転換植物は、完全な植物体に再生し、栽培する。

再生された形質転換植物、および、その子孫の植物は、植物体全体のビガー(vigor)、植物体および個別器官の大きさ・重量、収量、生長速度、病害・虫害に対する抵抗性、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対する抵抗性、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、等々、農業上有益なさまざまな形質について評価する。なお、ビガー(vigor)とは、植物体全体の活力や旺盛な生長力のことを言う。

【0052】

評価試験の結果、評価した形質について、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較して、表現型が変異した植物を選抜する。例えば、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較して、植物体全体のビガー(vigor)が高い、植物体および個別器官の大きく、重量が高い、収量が高い、生長速度が高い、病害・虫害に対する抵抗性が高い、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対する抵抗性が高い、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、等々を示す植物を選抜することができる。各形質について、選抜すべき変異の方向は、一方とはかぎらない。例えば、矮性という形質は、いろいろな作物において育種目標となる重要な農業形質であるので、植物体および個別器官の大きさについては、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較してより小さくなった植物も選抜することができる。他の形質についても同様である。

【0053】

選抜された植物については、子孫の植物の評価、さらにさまざまな形質に関する反復調査などを行い、変異の認められた形質の特性、遺伝様式、他の形質等との関連を評価することができる。様々な評価の後、新規な品種として農業的に利用することもできる。また、これらの植物のなかから、さらに優れた形質を示す植物が得られれば、このような植物に導入されていたゲノムDNA断片を、さらに価値の高いゲノムDNA断片として選抜することができる。

その際、導入されていたゲノムDNA断片の解析および取得は、通常のクローニングの方法により容易に行うことができる。

【0054】

(4) 選抜された植物に導入されたゲノムDNA断片は、前記のとおりゲノムクローンとして別途保管されており、クローニングベクターを用いて大腸菌で増殖する方法や、PCR法やLAMP法などの生化学的増殖法を用いて、必要量を製造することができる。そしてこれらを用いて、塩基配列の決定、含まれている遺伝子、イントロンその他の遺伝子要素の分析等を詳細に調査することができる。このゲノム断片は、既知の形質転換手法を用いて、任意の植物に導入することができるので、ゲノムDNA断片が由来する植物とは異種の植物の品種改良、同種の植物の異なる品種の品種改良、同種の植物の同一品種の植物の育種に利用することができる。

【0055】

(5) このように選抜されたゲノムDNA断片は、必要であれば、その全部または一部を、再度、同種または異種の植物に導入し、同様な評価を行うことにより、2次的な選抜工程に供することができる。この場合、工程(2)で用いたものと同一のクローニングベクターを用いて形質転換を行ってもよいし、別のクローニングベクターを用いてもよい。別のクローニングベクターを用いる場合には、工程(4)で選抜されたゲノムDNA断片をそのベクターにサブクローニングすることになる。クローニングベクター中のクローニングに用いる制限部位はクローニングベクターにより異なるので、用いる制限酵素によっては、工程(4)で選抜されたゲノムDNA断片の一部のみをサブクローニングするのが適当である場合がある。また、クローニングベクターまたはクローニングの方法によってクローニングできるDNA断片の大きさが異なるので、この理由によっても該DNA断片の一部のみをサブクローニングするのが適当である場合がある。該DNA断片の一部のみを用いて2次的な選抜工程を実施することの効果のひとつは、該DNA断片の一部のみを用いて形質転換を行って、該DNA断片の全部を用いた場合と同様な効果を示すことが判明した場合には、工程(4)で選抜されたゲノムDNA断片中の不要部分が明らかになることである。2次的な形質転換によって得られた形質転換植物、および、その子孫の植物は、植物体全体のビガー(vigor)、

植物体および個別器官の大きさ・重量、収量、生長速度、病害・虫害に対する抵抗性、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対する抵抗性、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、等々、農業上有益なさまざまな形質について評価する。

【0056】

評価試験の結果、評価した形質について、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較して、表現型が変異した植物を生じたゲノムDNA断片は、1次の選抜工程における栽培条件、植物種、等の条件にかかわらず好ましい表現型の変異を植物に生じることが可能であり、特に好ましいゲノムDNA断片として選抜できる。2次以降の選抜工程においても1次の選抜工程と同様に、例えば、当該ゲノム断片を導入しなかった植物と比較して、植物体全体のビガー(vigor)が高い、植物体および個別器官の大きさ、重量が高い、収量が高い、生長速度が高い、病害・虫害に対する抵抗性が高い、乾燥・高温・低温等さまざまな環境ストレスに対する抵抗性が高い、特定成分の増・減、特定酵素活性の増・減、等々を示す植物を選抜することができる。

【0057】

選抜された植物については、子孫の植物の評価、さらにさまざまな形質に関する反復調査などを行い、変異の認められた形質の特性、遺伝様式、他の形質等との関連を評価することができる。様々な評価の後、新規な品種として農業的に利用することもできる。

【0058】

2次選抜の結果、再度植物に導入しても農業上有益な変異をもたらすことができることが確認されたゲノムDNA断片や、他の植物にも農業上有益な変異をもたらすことができることが確認されたゲノムDNA断片が選抜されることになる。したがって、1次選抜のみの場合よりも、より価値の高いゲノムDNA断片が選抜されることになる。

【0059】

この選抜工程は何度でも繰り返すことができ、その結果、より価値の高いゲノムDNA断片を選抜することができる。

選抜されたゲノムDNA断片に含まれる遺伝子の転写物や、それに由来するcDNAの解析、また、ゲノムDNA断片の塩基配列から推定される遺伝子の特性等を、詳細かつ総合的に解析することにより、このゲノムDNA断片に含まれる遺伝子機能の推定や、ヘテロシスを引き起こす機構の解明に有用な知見を得ることができる。

【0060】

以上、ゲノムDNA断片の選抜方法を中心に、本発明を説明したが、本発明はこうして選抜された植物に農業上有益となりうる変異をもたらすことができるゲノムDNA断片、当該ゲノムDNA断片での形質転換により生じた農業上有益となりうる変異を有する植物も提供する。特定のDNA断片を植物細胞または植物組織に導入し、該細胞または組織をカルス化し、該カルスを培養しさらに完全植物体に再分化させる方法は、既に種々の方法が知られている。例えば、Hiei et al. Plant J. 6:271-282, 1994を参照のこと。再分化した植物を品種として固定するためには、Maruta et al. Molecular Breeding 8:273-284, 2001の方法が知られている。

【0061】

本発明はさらに、本発明のゲノムDNA断片を、植物の品種改良におけるマーカーとして使用する方法にも関する。すなわち、本発明のゲノムDNA断片を有する植物は、植物の品種改良の効率を高めるために使用できる。品種改良のための使用とは、本発明のゲノムDNA断片を他の植物に導入するための、ゲノムDNA断片供与用植物としての使用であってもよく、あるいは交配育種法により品種改良を行うための親植物としての使用であってもよい。例えば、本発明のゲノムDNA断片を有することが知られている植物と、品種改良をすべき植物とを掛け合わせて得られた、後代植物個体からゲノムDNAを調製し、該ゲノムDNA中に本発明のゲノムDNA断片が含まれているものを選択し、選択した後代植物個体を、特定のゲノムDNA断片の配列情報を用いて、該DNA断片をマーカーとすることは公知であり、例えばKomori et al. Euphytica 129:241-247, 2003等に記載されている。なお、マーカーとしての使用においては、ゲノムDNA断片全体をマーカーとしてもよく、該ゲノムDNA

断片の一部に特有の配列を含むなら、当該一部の配列をマーカーとしてもよい。

【0062】**[発明の効果]**

本発明のゲノムDNA断片選抜方法は、従来のゲノム解析の中で塩基配列を既知の塩基配列と比較検討する方法や、cDNAの機能推定する方法のように植物の遺伝子の機能を解明することを必要としない、新しいアプローチでヘテロシスに關与するDNA断片を探索する。

【0063】

本発明のゲノムDNA断片選抜方法は、ヘテロシス同様の効果を引き起こすゲノムDNA断片を、クローン化されたDNA断片として、かつ、植物への形質転換を容易に行うことができるDNA断片として獲得することを可能にしたため、古典的な育種法によるヘテロシスの利用と異なり、育種に伴う長い時間と多くの労力を必要としない。

【0064】

また、本発明のゲノムDNA断片選抜方法は、古典的な育種法によるヘテロシスの利用と異なり、一方の品種のゲノム断片を他方の品種に導入するため、親品種間の生殖的隔離の制限を受けず、従来の一代雑種育種法では不可能だった植物同士の組み合わせが可能となる。従って、本発明のDNA断片は、DNA断片由来の植物と同種であるか異種であるかを問わず、さまざまな植物に形質転換法により容易に導入し、育種に利用することができるので、短期間に、効率良くヘテロシスの利点を利用することが可能である。

【0065】

さらにまた、本発明のゲノムDNA断片選抜方法は、QTL解析と異なり、農業形質に關与する遺伝子座を探索する必要がないために、長い時間と多大な労力を要することなく、効率よく量的形質を増大または減少させるゲノムDNA断片を選抜することが可能である。

【0066】

また、本発明のゲノムDNA断片は、形質転換によりヘテロシス同様の発現を引き起こす効果があるため、通常の交配育種法においてマーカーとして利用することによって、交配後代の選抜効率を非常に高めることができる。

【実施例】**【0067】**

以下の実施例において、とくに明示しない限り、詳細な実験手順は、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (Supplements up to No. 59, July 2002, are included)、または、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001. に記載されている。

【0068】

実施例1. オリザ・ルフィポゴンからのゲノムDNAの抽出とゲノムDNAライブラリーの構築
農林水産省生物資源研究所より入手した、イネの近縁種オリザ・ルフィポゴンの種子を用い、温室で栽培したオリザ・ルフィポゴンの葉から、常法によりゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを制限酵素TaqIにより、部分的制限分解を行った後、ショ糖密度勾配遠心により、30 kbから50 kbの画分を調製した。この画分を用いて、コスミドベクターpSB200のNsp(7524)V (単にNspVと記す場合もある) 切断部位にクローニングを行い、ゲノムDNAライブラリーを構築した。

【0069】

pSB200は、Komari et al. (Plant J. 10:165-174, 1996) に記載されたpSB11より構築したクローニングベクターである。すなわち、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターに、ハイグロマイシン耐性遺伝子と、NOS遺伝子の3' 末シグナル、さらに、Nsp(7524)V切断部位をpSB11に付与したものである。pSB200を用いると、平均断片長約40 kb前後のゲノムDNAライブラリーを構築することができる。また、pSB200は、高等植物の形質転換用ベクターでもあり、ハイグロマイシン耐性遺伝子を選抜マーカーとしてさまざまな植物に遺伝子導入をすることができる。

【0070】

このライブラリーにおいてクローン化されたDNA断片の多くは、約30 kb から約50 kbの大きさであり、クローンの総数は、約8万個であった。なお、用いた大腸菌の菌株は、DH5 α 、およびGeneHogである。

【0071】

実施例2. オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの構成クローンによるジャポニカイネの形質転換

上記ゲノムDNAライブラリーの構成クローンを、個別に、アグロバクテリウム菌株LBA4404(pSB1) (Komari et al. 1996)に導入した。導入に用いた方法は、Triparental mating (Ditta et al. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 77:7347-7351, 1980)である。これらのアグロバクテリウムを、個別に、イネ（品種ゆきひかり）に導入した。形質転換法は、Hiei et al. 1994に従い、未熟胚にアグロバクテリウムを接種する方法により行った。品種ゆきひかりの未熟胚は、食用に販売されている玄米を播種し温室で栽培した植物、または、温室で栽培したその子孫の植物より得た。

【0072】

その結果、上記ゲノムDNAライブラリーに含まれる計5310個のゲノムDNA断片を、個別に導入した形質転換植物が得られた。また、それぞれのゲノムDNA断片について、1～5個の独立な形質転換体を得た。本明細書では、常法にしたがい、形質転換された当代の植物をT0世代の植物とよび、その子孫の植物を、世代順にT1世代の植物、T2世代の植物等と呼ぶ。

【0073】

ここで、この結果を先述した式にあてはめると、 $5310 = \ln(1-P) / \ln[1 - (40 \times 10^3 / 430 \times 10^6)]$ より、 $P=0.39$ となり、これら5310個のゲノムDNA断片に、任意のオリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNA断片が含まれる確率は39%である。

【0074】

実施例3. オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーに含まれるゲノムDNA断片によって形質転換されたジャポニカイネの評価と、変異の生じた植物の選抜

形質転換植物を温室で栽培し、それぞれの個体について、植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量を調査した。その結果、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAを導入していないゆきひかり（対照植物）と比較して、いずれかの形質について変異が認められた植物を選抜した。表1から6および図3に、選抜された植物の例と、導入されたゲノムDNA断片に付与した名称を示す。これらの例では、同一のゲノム断片が導入された形質転換体の中での複数のものが同様な変異を示し、選抜された。各ゲノム断片について、選抜された植物の測定値の平均を示す。植物体全体のビガーの外観観察に基づき選抜された植物は、多くの場合、何らかの測定数値についても変異が生じていた。下記の例は、いずれも、植物体全体のビガーと何らかの測定数値に基づいて、選抜が行われたものである。

【0075】

下記の例では、対照植物の測定値の分布を正規分布にあてはめた。この正規分布にしたがい、導入遺伝子の効果がないと仮定した場合に、選抜された形質転換植物系統の測定値を示すような系統が出現する確率を算出した。いずれの場合も、被選抜系統数に対する、出現確率の数値は著しく小さく、このような選抜系統が出現する期待値は1.0を大きく下回る。したがって、導入遺伝子の効果がないとする仮定は棄却され、選抜系統が有意な変異を示すことが、統計的に証明される。

【0076】

【表 1】

表 1 :
移植後 14 日目の草丈と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と
対照植物 (世代: T0、被選抜系統数 846)

区分	導入したゲノム DNA 断片	調査個 体数	測定値 の平均 (cm)	導入遺伝子の効 果がないと仮定 した場合にこの ような系統が存 在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A029B04 (SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:2)	5	38.8	0.000007	独立した形質転 換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A028C04 (SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:4)	4	39.0	0.00003	
対照植物		311	28.2		標準偏差:7.58

【0077】

【表 2】

表 2 :
移植後 21 日目の草丈と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と
対照植物 (世代: T0、被選抜系統数: 931)

区分	導入したゲノム DNA 断片	調査個 体数	測定値 の平均 (cm)	導入遺伝子の効 果がないと仮定 した場合にこの ような系統が存 在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A029B04 (SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:2)	5	50.6	0.0003	独立した形質転 換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A028C04 (SEQ ID NO:3 SEQ ID NO:4)	4	52.0	0.0003	
選抜された形質転換植物	A048F12 (SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:6)	5	51.8	0.0008	
対照植物		336	42.7		標準偏差:8.58

【0078】

【表 3】

表 3 :
移植後 14 日目から 21 日目までの相対生長率と植物体全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対照植物 (世代: T0、被選抜系統数: 841)

区分	導入したゲノム DNA 断片	調査個 体数	測定値 の平均	導入遺伝子の効 果がないと仮定 した場合にこの ような系統が存 在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A049A01 (SEQ ID NO:7 SEQ ID NO:8)	1	0.224	0.00002	独立した形質転 換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A046A06 (SEQ ID NO:9 SEQ ID NO:10)	3	0.136	0.00006	
選抜された形質転換植物	A045B09 (SEQ ID NO:11 SEQ ID NO:12)	3	0.141	0.00007	
対照植物		306	0.076		標準偏差:0.036

【0079】

【表 4】

表 4 :
成熟期の地上部重と植物体全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対
照植物 (世代: T0、被選抜系統数: 1464)

区分	導入したゲノム DNA 断片	調査個 体数	測定値 の平均 (g)	導入遺伝子の効 果がないと仮定 した場合にこの ような系統が存 在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A049A07 (SEQ ID NO:13 SEQ ID NO:14)	5	6.24	0.0000005	独立した形質転 換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A040D06 (SEQ ID NO:15 SEQ ID NO:16)	5	6.40	0.0000002	
選抜された形質転換植物	A048F12 (SEQ ID NO:5 SEQ ID NO:6)	5	6.33	0.0000007	
対照植物		558	3.56		標準偏差:1.78

【0080】

【表 5】

表 5 :

穂重と植物体全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対照植物 (世代 : T0、被選抜系統数 : 1464)

区分	導入したゲノム DNA 断片	調査個体数	測定値の平均 (g)	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A036A03 (SEQ ID NO:17 SEQ ID NO:18)	5	0.98	0.00005	独立した形質転換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A051E08 (SEQ ID NO:19 SEQ ID NO:20)	3	1.17	0.00001	
選抜された形質転換植物	A023D09 (SEQ ID NO:21 SEQ ID NO:22)	2	1.31	0.00009	
対照植物		558	0.55		標準偏差:0.30

【0081】

【表 6】

表 6 :

穂長と植物体全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対照植物 (世代 : T0、被選抜系統数 : 1464)

区分	導入したゲノム DNA 断片	調査個体数	測定値の平均 (cm)	導入遺伝子の効果がないと仮定した場合にこのような系統が存在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A030B02 (SEQ ID NO:23 SEQ ID NO:24)	5	14.4	0.00005	独立した形質転換植物の平均値
選抜された形質転換植物	A043F04 (SEQ ID NO:25 SEQ ID NO:26)	5	13.5	0.00005	
選抜された形質転換植物	A049E02 (SEQ ID NO:27 SEQ ID NO:28)	2	15.9	0.00009	
対照植物		557	12.3		標準偏差:1.85

【0082】

さらに形質転換植物の子孫の植物を栽培し、上記と同様に、植物の評価を行った。また、T1世代では、メンデルの法則にしたがって、導入したゲノム断片を含む個体と含まない個体が分離することが予想されるので、導入遺伝子の有無について、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて調査した。

【0083】

以下の表 7 から 9 に、選抜された植物の例と、導入されたゲノム DNA 断片に付与した名称を示す。これらの例では、同一の形質転換植物に由来する複数の子孫植物において、PCR法により導入遺伝子の存在が確認された植物がすべて同様な変異を示し、PCR法により導入遺伝子が検出されなかった植物がすべてそのような変異を示さなかった。また、下記の例では、いずれも植物体全体のビガー、および、何らかの測定数値に基づいて、選抜が行われたものである。

【0084】

下記の例では、対照植物の測定値の分布を正規分布にあてはめた。この正規分布にしたがい、導入遺伝子の効果がないと仮定した場合に、選抜された形質転換植物系統の測定値を示すような系統が出現する確率を算出した。いずれの場合も、被選抜系統数に対する、出現確率の数値は著しく小さいため、このような選抜系統が出現する期待値は1.0を大きく下回る。したがって、導入遺伝子の効果がないとする仮定は棄却され、選抜系統が有意な変異を示すことが、統計的に証明される。

【0085】

【表7】

表7：
移植後14日目の草丈と植物体全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と
対照植物（世代：T1、被選抜系統数114）

区分	導入したゲノム DNA断片	調査個 体数	測定値 の平均 (cm)	導入遺伝子の効 果がないと仮定 した場合にこの ような系統が存 在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A010C09 (SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30)	7	61.7	0.001	全個体PCR法により 遺伝子導入確認済み
選抜された形質転換植物	A011C02 (SEQ ID NO:31 SEQ ID NO:32)	7	62.5	0.0001	
選抜された形質転換植物	A010B03 (SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34)	5	60.4	0.002	
対照植物		84	58.5		標準偏差:3.5

【0086】

【表 8】

表 8 :
移植後 21 日目の草丈と植物体全体のピガーに基づき選抜された形質転換植物の例と
対照植物 (世代: T1、被選抜系統数 114)

区分	導入したゲノム DNA 断片	調査個 体数	測定値 の平均 (cm)	導入遺伝子の効 果がないと仮定 した場合にこの ような系統が存 在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A010C09 (SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30)	7	69.0	0.001	全個体PCR法により 遺伝子導入確認済み
選抜された形質転換植物	A011C02 (SEQ ID NO:31 SEQ ID NO:32)	6	71.0	0.000008	
選抜された形質転換植物	A010B03 (SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34)	5	71.0	0.000006	
選抜された形質転換植物	A009F06 (SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:36)	7	70.6	0.00003	
選抜された形質転換植物	A009E11 (SEQ ID NO:37 SEQ ID NO:38)	5	70.4	0.00003	
対照植物		84	66.1		標準偏差:3.4

【0087】

【表 9】

表 9 :
移植後 14 日目から 21 日目までの相対生長率と植物体全体のピガーに基づき選抜され
た形質転換植物の例と対照植物 (世代: T1、被選抜系統数: 114)

区分	導入したゲノム DNA 断片	調査個 体数	測定値 の平均	導入遺伝子の効 果がないと仮定 した場合にこの ような系統が存 在しうる確率	備考
選抜された形質転換植物	A010B03 (SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34)	7	0.032	0.00002	全個体PCR法により 遺伝子導入確認済み
選抜された形質転換植物	A008B02 (SEQ ID NO:39 SEQ ID NO:40)	7	0.024	0.002	
対照植物		84	0.018		標準偏差:0.007

【0088】

実施例 4. ストレス耐性評価等に基づく形質転換植物の選抜

実施例 2 において作出した形質転換植物、および子孫の植物について、乾燥耐性、耐塩性、および耐病性の評価を行った。そして、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAを導入していないゆきひかり (対照植物) と比較して、いずれかの形質について変異が認められた植物を選抜した。さらに、これらの植物に導入されたゲノムDNA断片を、イネに農業的に有益となりうる変異を起こすことのできるゲノムDNA断片として選抜した。

【0089】

実施例 5. オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの構成クローンによるト

ウモロコシの形質転換と、形質転換されたトウモロコシの評価

実施例 1 において作成した、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノム断片を含むアグロバクテリウムを用いて、トウモロコシの形質転換を行った。形質転換の手法は、Ishida et al 2002 (Plant Biotechnol. 20:57-66) に従った。導入品種はインブレッッド品種 A188 (農林水産省生物資源研究所より入手) である。また、ベクターとして pSB25UNpHm を用いて、実施例 1 と同様に、ゲノムライブラリー、およびオリザ・ルフィポゴン由来のゲノム断片を含むアグロバクテリウムを作成した。これを用いて、上記と同様にトウモロコシの形質転換を行った。pSB25UNpHm は、Ishida et al. Nature Biotech 14:745-750, 1996 に記載された pSB25 の bar 遺伝子のプロモーターを、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターに置き換え、さらに、Nsp(7524) V 切断部位、I-SceI 切断部位、I-CeuI 切断部位を付与したベクターである。pSB25UNpHm は、pSB200 と同様なクローニング能力があり、また、bar 遺伝子を選抜マーカーとして、トウモロコシを始めとするさまざまな植物に遺伝子導入をすることができ。

【0090】

形質転換植物およびその子孫の植物は、イネの場合と同様に温室で栽培し、植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量、乾燥耐性、耐塩性、および耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1 つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。さらに、これらの植物に導入されたゲノム DNA 断片を、トウモロコシに農業的に有益となりうる変異を起こすことのできるゲノム DNA 断片として選抜した。

【0091】

実施例 6. オリザ・ルフィポゴン由来のゲノム DNA ライブラリーの構成クローンによるタバコの形質転換と、形質転換されたタバコの評価

実施例 1 において作成した、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノム断片を含むアグロバクテリウムを用いて、タバコの形質転換を行った。形質転換の手法は、Komari Theor Appl Genet. 80:167-171, 1990 に従った。導入品種は SR1 (Kodama et al. Plant Physiol 105:601-605, 1994) である。

【0092】

形質転換植物およびその子孫の植物は、イネ・トウモロコシの場合と同様に温室で栽培し、植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、葉数、葉長、葉幅、葉重、地上部重、収量、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1 つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。さらに、これらの植物に導入されたゲノム DNA 断片を、タバコに農業的に有益となりうる変異を起こすことのできるゲノム DNA 断片として選抜した。

【0093】

実施例 7. アラビドプシス由来のゲノム DNA ライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、アラビドプシスからゲノム DNA を単離し、ゲノム DNA ライブラリーを構築し、このゲノム DNA ライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたアラビドプシスのエコタイプは Columbia であり、この種子は、国際的なアラビドプシス遺伝資源バンク (例えば、RIKEN Bioresource Center) から入手することができる。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノム DNA ライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1 つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、

またはタバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、アラビドプシス由来のゲノム断片として選抜した。

【0094】

実施例 8. ローズグラス由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、ローズグラス (*Chloris gayana*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたローズグラスの品種は、カリードとして市販されているものである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、ローズグラス由来のゲノム断片として選抜した。

【0095】

実施例 9. ソルガム由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、ソルガム (*Sorghum bicolor*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたソルガムの品種は、ゴールドソルゴーとして市販されているものである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、またはタバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、ソルガム由来のゲノム断片として選抜した。

【0096】

実施例 10. テオシント由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、テオシント (*Zea diploperennis*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたテオシントの品種は、牧草用テオシントとして市販されているものである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、テオシント由来のゲノム断片として選抜した。

【0097】

実施例 11. スーダングラス由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、スーダングラス (*Sorghum Sudanese*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたスーダングラスの品種は、牧草用として市販されているものである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、スーダングラス由来のゲノム断片として選抜した。

【0098】

実施例12. ミレット由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、ミレット (*Seteria italica*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたミレットの品種は、牧草用として市販されている極早生イタリアンミレットRである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、ミレット由来のゲノム断片として選抜した。

【0099】

実施例13. ギニアグラス由来のゲノムDNAライブラリーによる、イネ、トウモロコシ、および、タバコの形質転換と、形質転換植物の評価

オリザ・ルフィポゴンの場合と同様に、ギニアグラス (*Panicum maximum*) からゲノムDNAを単離し、ゲノムDNAライブラリーを構築し、このゲノムDNAライブラリーを構成するゲノムクローンを個別に、形質転換法によりイネ、トウモロコシ、および、タバコに導入した。用いたギニアグラスの品種は、牧草用として市販されているカラードギニアグラスである。形質転換植物およびその子孫の植物は、オリザ・ルフィポゴン由来のゲノムDNAライブラリーの場合と同様に、温室で栽培し、植物体全体の植物体全体のビガー、草丈、相対成長率、穂数、地上部重、穂重、穂長、可稈粒数、収量、葉数、葉長、葉幅、葉重、乾燥耐性、耐塩性、および、耐病性を調査することにより、導入したゲノム断片の効果を判定した。そして、これらの形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、または、タバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできる、ギニアグラス由来のゲノム断片として選抜した。

【0100】

実施例14. 選抜されたゲノムDNAクローンの解析

選抜されたゲノムDNA断片の両端280～500塩基分の塩基配列を調査した。その結果も表1から9および図3の各々のゲノムDNA断片に対応する配列番号により示されている。また、これらの断片をPCR法により検出することのできる、PCR用プライマーペアの配列を以下の表10に示す。

【0101】

【表 10 a】

表 10:

選抜された、オリザ・ルフィポゴンのゲノムに由来するゲノム DNA 断片の例と、それを検出することができる PCR 用プライマーペア

選抜されたゲノム DNA 断片	検出用プライマーペア 1	検出用プライマーペア 2
A029B04	5'-TCGAATTTGACCATGAGATACAGA-3' (配列番号 47) 5'-AAGAAAAAATGCTTGTGTACTGA-3' (配列番号 48)	5'-TCGAGCTAATTAAGTAGCCAAGTG-3' (配列番号 49) 5'-AAGTAACATGAGAAAAAAACAT-3' (配列番号 50)
A028C04	5'-TCGATTAAGACAGCAGGACGGTGG-3' (配列番号 51) 5'-GCAAGTGCCGTTACATGGAACCT-3' (配列番号 52)	5'-TCGAGGGCGTTGCGCCCCCGATGC-3' (配列番号 53) 5'-CCGTCTTGAAACACGGACCAAGGA-3' (配列番号 54)
A048F12	5'-TCGATGTAGTCCTCCTCGAGGCCG-3' (配列番号 55) 5'-CAACAACCGAGCAATACAGTTCAA-3' (配列番号 56)	5'-TCGAGTGGTCGGCGTCCCCCGGCC-3' (配列番号 57) 5'-CCGGAGTTCACCATGCCCCGGGGC-3' (配列番号 58)
A049A01	5'-TCGAACTAACGCTAACAACGTGCA-3' (配列番号 59) 5'-ATTTGGCGCATCTGAACACTGAAC-3' (配列番号 60)	5'-TCGAGTGCCATCCTCTTCTCAATG-3' (配列番号 61) 5'-GTTTTTGTTCGTTACAATGAGAAC-3' (配列番号 62)
A046A06	5'-TCGAACTACCGAGCTCCCCCTAAT-3' (配列番号 63) 5'-GTAGCTGAAAGGCGTAACCGTACC-3' (配列番号 64)	5'-TCGAACTTGTCTTCCAATTTGCGT-3' (配列番号 65) 5'-AACCCCGAACTTCAATCAAGTCCC-3' (配列番号 66)
A045B09	5'-TCGACGACGACGCGGCGAAGCCGA-3' (配列番号 67) 5'-CCGCCGCATCCCGCCGTCCCCGCG-3' (配列番号 68)	5'-TCGAGGATGCCTGTGGAGTGGTGT-3' (配列番号 69) 5'-CCGTGGACCGCCGCTTCGTTTCCC-3' (配列番号 70)
A049A07	5'-TCGAGCAGTCCGCCGGCAGCCGAC-3' (配列番号 71) 5'-ATTTCCCGAGCCGGGACGTGGCGG-3' (配列番号 72)	5'-TCGAACCATCTAGTAGCTGGTTCC-3' (配列番号 73) 5'-GCTTCAGCGCCATCCATTTTCGGG-3' (配列番号 74)

【0102】

【表 10b】

選 抜 さ れ た ゲ ノ ム DNA 断片	検出用プライマーペア 1	検出用プライマーペア 2
A040D06	5'-TCGACGGGTCTGAAACCTGGGAT-3' (配列番号 75) 5'-GAGCAGCCGCGCCGTCCTACCTAT-3' (配列番号 76)	5'-TCGAGCCCCCAACTTTCGTCTCTTG-3' (配列番号 77) 5'-AGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGT-3' (配列番号 78)
A036A03	5'-TCGAAAATGACCGTCAACAAAACC-3' (配列番号 79) 5'-ATCAAAAAGGCATCATTTGGTGAG-3' (配列番号 80)	5'-TCGATGCATTGAGCAGAAAGGAAT-3' (配列番号 81) 5'-ATATTCTTCCACCAAAAAGTATCT-3' (配列番号 82)
A051E08	5'-TCGATGAAGAACGTAGCGAAATGC-3' (配列番号 83) 5'-ATATGCTTAAACTCAGCGGGTAGT-3' (配列番号 84)	5'-TCGATGCGAGAGCCGAGATATCCG-3' (配列番号 85) 5'-CCCGTCGCTCCTACCGATTGAATG-3' (配列番号 86)
A023D09	5'-TCGACGCCATACTGATGAGCAATG-3' (配列番号 87) 5'-GTTGATGCTCTTCTCTGCGTCATC-3' (配列番号 88)	5'-TCGAATGCCAGTTAAAGTGATGCC-3' (配列番号 89) 5'-CTACTGCGCCGAGCCCACGCTGAG-3' (配列番号 90)
A030B02	5'-TCGAAGCTTCACAGTTGATAACTT-3' (配列番号 91) 5'-GAGGTTTCGAACCCAGGTTGTCTA-3' (配列番号 92)	5'-TCGAGGTGAACATTTTTTTTCTT-3' (配列番号 93) 5'-GGCCCTCGGGGCCGAGGCGGGAGT-3' (配列番号 94)
A043F04	5'-TCGACCACCTTCTCAGAAGCAAAA-3' (配列番号 95) 5'-AACATCCAACAGATTGAGACACTT-3' (配列番号 96)	5'-TCGATAGCACCATTGGGACTATAC-3' (配列番号 97) 5'-TGATTCTGAACAAATTTAGGGTATT-3' (配列番号 98)
A049E02	5'-TCGATTAAAGACAGCAGGACGGTGG-3' (配列番号 99) 5'-CCCGGCTCGGGAAATCTTAACCCG-3' (配列番号 100)	5'-TCGACCGAATCGGGTTTTTCGGTCG-3' (配列番号 101) 5'-GGATGGCCGGGCTGCCACGCGCAC-3' (配列番号 102)
A010C09	5'-TCGACCGAATCGGGTTTTTCG-3' (配列番号 103) 5'-ACCGAAAACGTGTGCGGAGC-3' (配列番号 104)	5'-TCGATGTCGGCTCTTCCTAT-3' (配列番号 105) 5'-GGGCTGGATCTCAGTGGATC-3' (配列番号 106)

【0103】

【表 10c】

選抜されたゲノム DNA 断片	検出用プライマーペア 1	検出用プライマーペア 2
A011C02	5'-TCGAGTTAGGGATTTGATTG-3' (配列番号107) 5'-AATTTGTAATGCTGCGATCT-3' (配列番号108)	5'-TCGAAGGTGGTGTCAAATTA-3' (配列番号109) 5'-GTTGTCGCTGCCACCTGATC-3' (配列番号110)
A010B03	5'-TCGAACAGCCGACTCAGAAC-3' (配列番号111) 5'-CCCGGATCGGCCCGAGGGAC-3' (配列番号112)	5'-TCGAAGGATCAAAAAGCAAC-3' (配列番号113) 5'-GGCTTGGCGGAATCAGCGGG-3' (配列番号114)
A009F06	5'-TCGAGTTTGATTTCGGATTTCG-3' (配列番号115) 5'-GGCGGCGGCGGCTCGGCCGA-3' (配列番号116)	5'-TCGAATAGCCGTGCCCCGCGG-3' (配列番号117) 5'-TCTAAGCAGCGGAAAATAAA-3' (配列番号118)
A009E11	5'-TCGAGTTGGAGCACGCCTGT-3' (配列番号119) 5'-GTTGTTACACACTCCTTAGC-3' (配列番号120)	5'-TCGAGGCGGCCGGCCGCGGC-3' (配列番号121) 5'-CCTATCGATCCTTTAGACCT-3' (配列番号122)
A008B02	5'-TCATATATTAATTCTCTCTCTA-3' (配列番号 123) 5'-TCATGATAGTCAATATGGGCCCTC-3' (配列番号 124)	5'-TCGAAGACGCGGAATGGTAGTGAA-3' (配列番号 125) 5'-GGATAGAGATATGGTATAAGAAAT-3' (配列番号 126)
A083G04	5'-TCGATGGTAGGATAGGGGCTACC-3' (配列番号 127) 5'-TTAAGGCCAGGAGCGCATCGCCGG-3' (配列番号 128)	5'-TCGAGTTATCATGAATCATCGGAT-3' (配列番号 129) 5'-GACAGCCCGCCGGCCGCGCCGT-3' (配列番号 130)
A088E02	5'-TCGAGCCTCCACCAGAGTTTCCTC-3' (配列番号 131) 5'-CGGCTGGTCCGCCGATCGGCTCGG-3' (配列番号 132)	5'-TCCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTA-3' (配列番号 133) 5'-TGCAATGATCTATCCCCATCACGA-3' (配列番号 134)
A089F12	5'-TCGAGCAGTCCGCCGGCAGCCGAC-3' (配列番号 135) 5'-ATTTCCCGAGCCGGGACGTGGCGG-3' (配列番号 136)	5'-TCGAACAGCCGACTCAGAACTGGT-3' (配列番号 137) 5'-CTCAAGTCATTTACAAAAGTCGGA-3' (配列番号 138)

【0104】

実施例 15. 選抜されたゲノム DNA 断片の植物への導入

実施例 3 ~ 13 において選抜されたゲノム DNA 断片を、実施例 2、実施例 5、または、

出証特 2005-3006221

実施例 6 記載の方法により、イネ、トウモロコシ、およびタバコに導入した。得られた形質転換植物、およびその子孫植物を、実施例 3～13 と同様に評価した。そして、評価した形質のうち、1つまたは複数の形質について、変異の生じた形質転換植物およびその子孫植物を選抜した。選抜された植物に導入したゲノム断片を、イネ、トウモロコシ、またはタバコに、農業的に有益となりうる変異を起こすことのできるゲノム断片として選抜した。

【0105】

2次選抜の結果、再度植物に導入しても農業上有益な変異をもたらすことができることが確認されたゲノムDNA断片や、他の植物にも農業上有益な変異をもたらすことができることが確認されたゲノムDNA断片が選抜された。したがって、1次選抜のみの場合よりも、より価値の高いゲノムDNA断片が選抜されたことになる。

【0106】

このようにして選抜されたゲノムDNA断片の例を表 11 に示す。

【0107】

【表 11】

表 11: 2次選抜で選抜されたゲノムDNA断片

由来植物	ゲノム DNA 断片	1 次選抜に用いた植物	1 次選抜において認められた形質変異	2 次選抜に用いた植物	2 次選抜において認められた変異
オリザ・ルフィポゴン	A009E11 (SEQ ID NO:37 SEQ ID NO:38)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増
オリザ・ルフィポゴン	A009F06 (SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:36)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増
オリザ・ルフィポゴン	A010B03 (SEQ ID NO:33 SEQ ID NO:34)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増
オリザ・ルフィポゴン	A010C09 (SEQ ID NO:29 SEQ ID NO:30)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増
オリザ・ルフィポゴン	A011C02 (SEQ ID NO:31 SEQ ID NO:32)	イネ	草丈の増	イネ トウモロコシ	草丈の増 草丈の増

【図面の簡単な説明】

【0108】

【図 1】 図 1 は、クローニングベクター pSB200 の遺伝子地図である。

【図 2】 図 2 は、クローニングベクター pSB25UNpHm の遺伝子地図である。

【図 3】 図 3 は、穂の大きさの外部観察、一穂の粒数、および、植物全体のビガーに基づき選抜された形質転換植物の例と対象植物を示す写真である（世代：T0、被選抜系統数：5310）。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Tobacco Inc.

<120> A method for selecting genomic DNA fragment.

<130> 03-1959

<160> 138

<210> 1

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A029B04 F: one terminus of DNA fragment A029B04.

<400> 1

tcgaatttga ccatgagata cagatatgaa tcggtagaat cattataagc atgattactg	60
attcttaaaa agatgttgac aaatccagat tcccaattcc tcgcaggcct aatttaattt	120
tcccccatgg cacagggcca gcgaggtcga tcaatcacta tgggagccat actattgtag	180
aagttctcaa tgagatattt gcaagcaatg tggcagaact ctctgtgcag atagtgaagg	240
tagctctgcc atgtacacag gagtgaggtg atgaaccagc accctgtgtt ttaacaact	300
agataagggtg tttggcttct attgtagagc tgcattggcat atatataatt agtagaagta	360
aacatgcagt acattttcag tacacaagca tttttttctt	400

<210> 2

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A029B04 R: the other terminus of DNA fragment A029B04 to A029B04 F.

<400> 2

tcgagctaat taactagcca agtgtagggt tgggagacat ctggatatca cttctgacgt	60
tttcctatgt gtaactact gagatttgggt atggcagttt ctgtggcact tgcacaagga	120
ccagttttat tcctccttga actgtaatta accacctttt tcaccgacct tcctttcgag	180
tagctagaga catttctaca tgctcgaatt aattagttaa tgctaggaac tggatcccta	240
tttttgagtt acagaagttg ctagctactc tgttcttagt ttctcacgga gtgcagctag	300
ctagcttcga taaacagctc aaaaaacaga aatttagtcc tggcaaatgt atgtgccaaa	360
cttaatgcat gagaatatgt ttttttttct catgttactt	400

<210> 3

<211> 300

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A028C04 F: one terminus of DNA fragment A028C04.

<400> 3
 tcgattaaga cagcaggacg gtggtcatgg aagtcgaaat ccgctaagga gtgtgtaaca 60
 actcacctgc cgaatcaact agccccgaaa atggatggcg ctgaagcgcg cgaccacac 120
 caggccatct gggcgagcgc catgccccga tgagtaggag ggcgcggcgg ccgccgcaa 180
 acccggggcg cgagcccggg cggagcggcc gtcggtgcag atcttggtgg tagtagcaaa 240
 tattcaaaat agaactttga aggccgaaga ggagaaaggt tccatgtgaa cggcacttgc 300

<210> 4
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A028C04 R: the other terminus of DNA fragment A028C04 to A028C04 F.

<400> 4
 tcgaggcgt tgcgccccg atgcctctaa tcattggctt taccgatag aactcgtaat 60
 gggctccagc taccctgagg gaaacttcgg agggaaccag ctactagatg gttcgattag 120
 tctttcgccc ctatacccaa gtcagacgaa cgatttgcac gtcagtatcg cttcgagcct 180
 ccaccagagt ttctctggc ttgccccgc tcaggcatag ttcaccatct ttcgggtccc 240
 gacaggcgtg ctccaactcg aacccttcac agaagatcag ggtcggccag cgggtcggcc 300
 cgtgagggcc tcccgctcgt cagcttcctt gcgcatccca gggttcagaa cccgtcgact 360
 cgcacgcatg tcagactcct tggtccgtgt ttcaagacgg 400

<210> 5
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A048F12 F: one terminus of DNA fragment A048F12.

<400> 5
 tcgatgtagt cctcctcgag gccgaggctg acagagatgg cgccgagaag ccggagcccc 60
 agttgccgga cttctcggca gtacgtgctc ataatctctc tgcatgccag gaaaaagtgc 120
 aacggaaaat taagcgcca cgccttaatt ttggcgtttt actgaaacta gttgctgtcc 180
 tggacttcag ctagcttgat ttactccag cacattggat tttggaatta acagacgaag 240
 taggagaccg atgaagaatc ggtccccttc tttttgcgag gtcaagggtg cggtttacct 300
 tttccacgat ttgtctcgag taaaaatctc gcaagttcat gcatgtctct ggtagggtga 360
 ttagtcttct acgtgattga actgtattgc tcggttggtg 400

<210> 6
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A048F12 R: the other terminus of DNA fragment A048F12 to A048F12 F.

<400> 6
 tcgagtggtc ggcgtccccc ggccgggctc catacggctg gccacgggcg acggcactga 60
 gctgcctaac ccgtggaaca tcgaacacct tcgtcgcttc tacccttgag gggggggctcg 120
 ggtgtcaggt ttcgggctcg ggccaacccc gcacccctc gggcgtgcag ggttggccgg 180
 gggctgccac acatgcacat tcttatttct cttatttcag tatttcaata aaagcagttt 240
 caatttccta aaggctgtat ctgtgctgtt gtttcttttg aagaatcttg acttgaaata 300
 ggtcactcgt gctcaatcct gccctcgggg gctcgggctg gctaaaaatcg ccaaacgggg 360
 cccagaaccg agccgtgccc cggggcatgg tgaactccgg 400

<210> 7
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A049A01 F: one terminus of DNA fragment A049A01.

<400> 7
 tcgaactaac gctaacaacg tgcagaaaat ctccctgcat ctcgtgatgg ttcattggat 60
 cgtagtgggc tccaataagt ggggcttcca ggcccatctt gctggggccc aatagtaccg 120
 aaaacgaaag tagcaccaag cttccatgca cgacgacaga aacgagcgat gacattgttg 180
 tttctttggg aagaaggaca acacaaccga tccgttagct tgtccatttc gaccctaagt 240
 ggtgcaaaat gattggagaa ttagtcacca aaataaataa ttgtactagt tctaagttct 300
 gataacacaa ctagtgacca accatgacta gttctttaga gatgggtttc agattttcag 360
 tacagagccg acgcaagtgc agtggttcaga tgcgccaat 400

<210> 8
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A049A01 R: the other terminus of DNA fragment A049A01 to A049A01 F.

<400> 8
 tcgagtgccca tcctcttctc aatgagagta accattgaaa ttctaacatc tattccatca 60
 taaattcttg tttggagcag ctgttttggg cttagacaatt aaaacgcgtg ttaagaaaaa 120
 caccgctctt tctattacaa tattttgctg tgggatttcc ctgattaata ccatatgaac 180
 ttttatctta catattgcat tgtcttcatc gccaaaagtg agtgactttc agttttcttt 240
 ttctatatat gcagcacaga tgattttgtt ttagaacgat atgatacaga gataacaacc 300
 gaatcaacc catttgctat tgcacttgca aaacatttgc actctgttgg cgctaagatg 360
 tatggagcat tctggtgttc tcattgtaac gaacaaaaac 400

<210> 9
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A046A06 F: one terminus of DNA fragment A046A06.

<400> 9

tcgaactacc	gagctcccc	taatcatttc	gtcttccaag	aagacgacgt	gtctcgtttc	60
tacaaacttt	gtataattgt	ttggataata	gaaacgataa	ccttttgatc	tttcaggata	120
gcgaataaaa	tggcagctga	ctattttggg	atccaatttc	caaggttttg	gttaaatttt	180
ttagcctcta	caggactccc	ccacacatgg	aggtgagcta	gcgagggtac	tcttcccgtc	240
catagctcat	acagtgtttg	ggcaccgatt	tgcttggaa	tctgttgagg	atatgaatgg	300
cggtttttaa	tgtctctatc	cataaaccca	atggttagag	ggagtagctc	atcatgctgc	360
gcaccatata	cataagggtg	cggttacgcc	tttcagctac			400

<210> 10

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A046A06 R: the other terminus of DNA fragment A046A06 to A046A06 F.

<400> 10

tcgaacttgt	cttccaattt	gcgtacctct	tgtcgatatg	ccatcatggt	gtcgtcaagg	60
caggaccact	ctttcataac	ttggttgaca	actagctgtg	aatcgccctg	aactattaga	120
cgctttatcc	ctagagaaat	tgcgatccgc	agtccatgga	ggagcgcctc	gtactcggcg	180
acgttgtgag	acgccgaaaa	atgtatccaa	agcacatagc	ttaatctttc	tccagtcggg	240
gaaattaaaa	ccactcctgc	tccagtgtcc	gaaagtcgct	tcgaccgctc	gaaatgcata	300
gtccagtgtc	caatcttctc	cgcgggggta	tcctcctggc	actcgggtca	ttcggcgaca	360
aaatcagcta	acgcttggga	cttgattgaa	gttcgggggt			400

<210> 11

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A045B09 F: one terminus of DNA fragment A045B09.

<400> 11

tcgacgacga	cgcggcgaag	ccgaaggagg	cggcaccgag	aggggaggaa	gtccgggagc	60
acggcggcgg	cgaaccggag	ctcgtcggcg	acggcggaga	gagagggaaga	cgacgcgagc	120
gcgattccga	cgggtgagagc	gagcggcgaa	cggcggaac	ggaggagaga	ggcgcgaggg	180
acgcttaa	atagcagggga	gggggagaga	gcggccggag	agggagaaat	cggccgcgga	240
aatctcggcc	gccattgatt	gcgccggcga	ggaatgcggg	agagaatccg	gacgcacccg	300
agggagagag	agaggggggga	aagcggggga	aacgggagag	ggaatcgcg	ggaatgattc	360
ccccttcatt	atggcgcgcg	gggacggcgg	gatgcggcgg			400

<210> 12

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A045B09 R: the other terminus of DNA fragment A045B09 to A045B09 F.

<400> 12

tcgaggatgc	ctgtggagtg	gtgttcccg	tcagttcaa	gtcaaggctt	agctccagtt	60
ttcttttgtt	ttccgctgca	tttctgtaag	acttttatga	tgtttgtaag	acgtggatct	120
gaatgtcaac	atagtcgttt	gtgtaccccg	gccggtcctg	gacgggggtt	ttaatgcaca	180
ttctgcttgg	aatcctattc	gggaatttct	gggcgtgaca	gcggctgaca	gccggggccc	240
acgcggcagc	cgctcgggtg	gcccgaaggc	ggccacggcg	gcgcggccgg	cgggagggcg	300
ctcgcccgcg	cccctatggt	cgccggcgcg	ggccataggc	acgtcggagc	agcgcccgag	360
agaggggagg	gaaaggggga	aacgaagcgg	cggtccacgg			400

<210> 13

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A049A07 F: one terminus of DNA fragment A049A07.

<400> 13

tcgagcagtc	cgccggcagc	cgacgggttc	ggggccggga	cccccgagcc	cagccctcag	60
agccaatcct	tttcccgaag	ttacggatcc	gttttgccga	cttcccttgc	ctacattgtt	120
ccattggcca	gaggctgttc	accttgagga	cctgatgcgg	ttatgagtac	gaccgggcgt	180
ggacggtact	cggctcctccg	gattttcaag	ggccgccggg	ggcgcaccgg	acaccgcgcg	240
acgtgcggtg	ctcttccggc	cgctggaccc	tacctccggc	tgaaccgttt	ccagggttgg	300
cgggccgtta	agcagaaaag	ataactcttc	ccgaggcccc	cgccggcgtc	tccggacttc	360
ctaacgtcgc	cgtcaaccgc	cacgtcccgg	ctcgggaaat			400

<210> 14

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A049A07 R: the other terminus of DNA fragment A049A07 to A049A07 F.

<400> 14

tcgaaccatc	tagtagctgg	ttccctccga	agtttccctc	aggatagctg	gagcccatta	60
cgagttctat	cgggttaaagc	caatgattag	aggcatcggg	ggcgcaacgc	cctcgacctt	120
ttctcaaact	ttaaataagg	aggacggcgc	ggctgctccg	gtgagccgcg	ccacggaatc	180
gggagctcca	agtgggcat	ttttggtaag	cagaactggc	gatgcgggat	gaaccggaag	240
cctggttacg	gtgccgaact	gcgcgctaac	ctagaacca	caaagggtgt	tggtcgatta	300
agacagcagg	acggttggtc	tggaagtcga	aatccgctaa	ggagtgtgta	acaactcacc	360
tgccgaatca	actagccccg	aaaatggatg	gcgctgaagc			400

<210> 15

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A040D06 F: one terminus of DNA fragment A040D06.

<400> 15

tcgacgggtt	ctgaaacctg	ggatgcgcaa	ggaagctgac	gagcgggagg	ccctcacggg	60
ccgcaccgct	ggccgaccct	gatcttctgt	gaagggttcg	agttggagca	cgcctgtcgg	120
gacccgaaag	atggtgaact	atgcctgagc	ggggcgaagc	cagaggaaac	tctggtggag	180
gctcgaagcg	atactgacgt	gcaaatcggt	cgtctgactt	gggtataggg	gcgaaagact	240
aatcgaacca	tctagtagct	ggttccctcc	gaagtttccc	tcaggatagc	tggagcccat	300
tacgagttct	atcgggtaaa	gccaatgatt	agaggcatcg	ggggcgcaac	gccctcgacc	360
tattctcaaa	ctttaaatag	gtaggacggc	gcggctgctc			400

<210> 16

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A040D06 R: the other terminus of DNA fragment A040D06 to A040D06 F.

<400> 16

tcgagccccc	aactttcggt	cttgattaat	gaaaacatcc	ttggcaaagt	ctttcgagct	60
tgttcgtctt	tcataaatcc	aagaatttca	cctctgacta	tgaaatacga	atgccccga	120
ctgtccctat	taatcattac	tccgatcccg	aaggccaaca	caataggacc	ggaatcctat	180
gatgttatcc	catgctaatt	tatccagagc	gatggcttgc	tttgagcact	ctaatttctt	240
caaagtaacg	gcgccggagg	cacgaccggg	ccagttaagg	ccaggagcgc	atcgccggca	300
gaagggtcga	gcaggtcggt	gctcgccgtg	aggcggaccg	gccggcccgg	cccaaggtcc	360
aactacgagc	ttttaactg	caacaactta	aatatacgct			400

<210> 17

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A036A03 F: one terminus of DNA fragment A036A03.

<400> 17

tcgaaaatga	ccgtcaacaa	aaccccccaa	gcttgaacct	ttgctcatcc	cgagtgaagg	60
acgaaaggaa	acaaagactt	ggatgttgat	cagaagttgc	tactatgctg	catatctcaa	120
agatacaggt	gcaaggcata	tgtactctct	cttagattaa	ataatctttg	gcatggtggc	180
ttatccttac	ccctgattct	catgagacac	tacttctcct	tgccctgggc	ggttgaaaga	240
cagaacaaca	attagagcac	caatcacccg	atctttatct	aattcttatt	ctggaagttt	300
ttcaaatgat	tttgcaaaga	aaaccaagtt	cctcaaatga	ttcactcagt	ctctctaagt	360
gtatcatttc	gaattcctca	ccaaatgatg	cctttttgat			400

<210> 18

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A036A03 R: the other terminus of DNA fragment A036A03 to A036A03 F.

<400> 18
 tcgatgcatt gagcagaaag gaatattgta atcaagcaat tatccaagga tgcccacatg 60
 aactgcaaaa ggaaatacaa caattaagat tggagtttac agaaccgga cttttggcaa 120
 ctctagaggt aaaaccaaca cttctagatc aagtctgtga tgctcagaag gaagatgaag 180
 aattagaaga aatttgacac ggagttcaaa aaagaattga aatggatttt acggaaaaca 240
 atgatggagc tcttagattt aaaggacgtc tttgcatccc agacaggaaa gaaatcaagg 300
 atttaatttt gcaagaagcc catcgctcac tcttttctat ccatcctgga agcaccaaga 360
 tgtatcatga cctaaaagat actttttggt ggaagaatat 400

<210> 19

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A051E08 F: one terminus of DNA fragment A051E08.

<400> 19
 tcgatgaaga acgtagcgaa atgcgatacc tgggtgtgaat tgcagaatcc cgtgaacat 60
 cgagtctttg aacgcaagtt gcgcccagg ccatccggcc gagggcacgc ctgcctgggc 120
 gtcacgcaa aagacgtcc acgcgcccc cctatccggg agggcgcggg gacgcggtgt 180
 ctggcccc ggcctcgcg gcgcggtggg ccgaagctcg ggctgccggc gaagcgtgcc 240
 gggcacagcg catggtggac agctcacgt ggctctaggc cgcatgac cccggcgcg 300
 ggccggcgcg atggcccctc aggacccaaa cgcaccgaga gcgaacgcct cggaccgcga 360
 cccaggtca ggcgggacta cccgctgagt ttaagcatat 400

<210> 20

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A051E08 R: the other terminus of DNA fragment A051E08 to A051E08 F.

<400> 20
 tcgatgcgag agccgagata tccgttgccg agagtcgtgt ggatttagct cgtggtatcg 60
 cgccgcgccc ccggacggcc agggccgacc gggccggcgc ggggcgtatc gctgtgttcc 120
 ttgacgccgt cggcgccgtg ggttctgttg cggcccgggg gcctcggttg cctcgcgcgc 180
 gagcgctcgg cgggcagggg tgacgcgttc gcggtctgtt ttggtcaggg tcacgacaat 240
 gatccttccg caggttcacc tacggaaacc ttgttacgac ttctccttcc tctaaatgat 300
 aaggttcaat ggacttctcg cgacgtcggg ggcggcgaac cgccccgctc gccgcgatcc 360
 gaacacttca ccggaccatt caatcggtag -gagcgacggg 400

<210> 21

<211> 300

<212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A023D09 F: one terminus of DNA fragment A023D09.

<400> 21		
tcgacgcat	actgatgagc	aatgattcgt aatactacta attaatctag cagcatgata 60
cggagcatca	acgttaagta	agatgagcag catccatcaa gaagaaggaa gcgtctcctc 120
cactgccgag	tgacaccacg	ctcttgicct gtaccactat cgctacttaa tgcctaattcc 180
tcctcctgtc	gtacaagtac	cacgaaacag aatataaaca ataaagacaa gtttttttaa 240
aaaaaaattg	tctgaagatt	aattaagagt tagtgagatg acgcagagaa gagcatcaac 300

<210> 22
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A023D09 R: the other terminus of DNA fragment A023D09 to A023D09 F.

<400> 22		
tcgaatgcc	gttaaagtga	tgccattcca gcgaatcaac tcttgcgatg gtagatgtgc 60
aatttttca	ccagatttgg	ctgatagcca ttagtctgct gtactattaa acctgctctg 120
atctaggggt	ccagcccccc	accacggccg cacagccatg gatgagcatc caagcagcca 180
cgcgcgagcg	tgtgtggagg	cggcccagac tgaagcaa
tggtgaaggc	gagcacacca	aaccaaaaac caaatcaaaa gctcaactga aacaaacgta 240
cgaatcatcc	atccatcgcg	cgggtggtggc tcagatctca gcgtgggctc ggcgtagtag 300
		360

<210> 23
 <211> 300
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A030B02 F: one terminus of DNA fragment A030B02.

<400> 23		
tcgaagcttc	acagttgata	acttgacatg gtcacagca ctatacatgt catgttggga 60
gttagcagcc	ttcaactagt	accttattag gtgcctgaat aatcgagggtg gtataattca 120
ttcagacatg	tgcccgttaa	aacttctagg gaaacttaaa ttatggcctt tacattaaaa 180
aaactaaaat	tattttctta	aaaaaactta aattatgggt cagactctac aagaaacgcc 240
cataagtctt	tcgactagct	tcacaagggt gtgggctaga caacctgggt tcgaaacctc 300

<210> 24
 <211> 280
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A030B02 R: the other terminus of DNA fragment A030B02 to A030B02 F.

<400> 24

tcgaggtgaa ctatTTTTTT tctTTTTTTT agttcgTTat tctTTTcttt actacggtaa	60
atttcagtaa atacaaggag tacatcaatt tttccgaaaa tttctatccc aattgtcggt	120
gacatgggac cgggagtatc atgactagag gcttgaggca gacacaatcg cccacgtggc	180
ctggcaccct cgggggacgt cggggcccag ggtgatgtgt tcgccctcct cttagtctcc	240
ccgaggggggt cggaccactc ccgcctcggc cccgagggcc	280

<210> 25

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A043F04 F: one terminus of DNA fragment A043F04.

<400> 25

tcgaccacct tctcagaagc aaaatgtaca aacagagggt gctgaagaag attcgagttt	60
ccattggcac aattcagatg gcagtccaca tgctgagctt gaagatagac atggatacag	120
acacaagagg gcatgctgca cgcgtattgc tggagctcgc gcctgacctc cagggtggaga	180
gctttcctgg tatectgcct gcaatctcct cactgctcag cacaacaag ggggccacaa	240
acagtgaag ctccagcaac ccaatcactg cagtggcgga cgcaacttta aaatatagat	300
gggacggaga acggagatgt tcactcgata agagcaatcg aacacaacac atatcgtatt	360
aatagtttat tcgtataagt gtctcaatct gttggatgtt	400

<210> 26

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A043F04 R: the other terminus of DNA fragment A043F04 to A043F04 F.

<400> 26

tcgatgcac cattgggact atactggaca taccaactaa gaccaaggat aggctgaaat	60
cacgtaagga cctcgtggat atgcaaataa ggaaagagta ccttccgcct gcttgctaca	120
ccttgacaag agaggacaaa attgcattgt gcaaattcct acatgggggtg agagtgccta	180
ctgccttctc ctcaaacatt aagcgactag tgcgatgaa ggatctgtcg ctttcaggct	240
acaattctca taactgtcat gtaatgtca cagtattcct tgccattgca actagagcag	300
tcgaaccac gtctgcagaa attagcacca tatacaatcc ttacatttat tcgaaatgca	360
gaataacata acatacaata ccctaaattt gttcgaatca	400

<210> 27

<211> 400

<212> DNA

<213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A049E02 F: one terminus of DNA fragment A049E02.

<400> 27
 tcgattaaga cagcaggacg gtggtcatgg aagtcgaaat ccgctaagga gtgtgtaaca 60
 actcacctgc cgaatcaact agccccgaaa atggatggcg ctgaagcgcg cgacccacac 120
 caggccatct gggcgagcgc catgccccga tgagtaggag ggcgcggcgg ccgccgcaaa 180
 acccggggcg cgagcccggg cggagcggcc gtcggtgcag atcttggtgg tagtagcaaa 240
 tattcaaatg agaactttga aggccgaaga ggagaaaggt tccatgtgaa cggcacttgc 300
 acatgggtaa gccgataccta agggacgggg taaccccggc agagagcgcg accacgcgcg 360
 tgccccgaaa gggaatcggg ttaagatttc ccgagccggg 400

<210> 28
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A049E02 R: the other terminus of DNA fragment A049E02 to A049E02 F.

<400> 28
 tcgaccgaat cgggttttcg gtcggtcggc cgggtgggtg ctgcacgagc cagcccttcc 60
 caactcgcgc acggttgccg gtcggtcggc ccggcgccc aacgtggacc gaaccgggtg 120
 ccgtgcgcgt ggcagcccgg ccatcccttc ccccctacta tagtcgtggg ccatagccag 180
 cccacgcac ccctagcgtc cagcccttca cagctcgcac acagttttcg gccggtcgcc 240
 cggcggaccg aacgtcgacc gaatcgggtt ttcggtcggg cggccgggtg gtggctgcac 300
 gagccagccc ttccaactc gcgcacgggt gccggtcggg cggcccggcg cccgaacgtg 360
 gaccgaaccg ggtgccgtgc gcgtggcagc ccggccatcc 400

<210> 29
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A010C09 F: one terminus of DNA fragment A010C09.

<400> 29
 tcgaccgaat cgggttttcg gtcggtcggc caggnggggtg gctgcacgag ccagcccttc 60
 ccaactcgcg caggttgcc ggctcggtcgg cccggcgccc gaacgtggac cgaaccgggt 120
 gccgtgcgcg tggcagcccg gccatccctt ccccctact atagtctggg gccatagcca 180
 gcccaacgca cccctagcgt ccagcccttc acagctcgca cacagttttc ggccggtcgt 240
 ccggcggacc gaacgtcgac cgaatcgggt tttcggccgg tcggtggctg cacgagccag 300
 cccttccaa ctgcgcacg gttgccggtc ggctcggccc gcgaccgaac gtggaccgaa 360
 ccgggtgccg tgcgcgtggc agcccggcca tcccttcccc cctactatag tcgtggggcc 420
 atagccagcc caacgcaccc ctacgctgca gcccttcaca gctcgcacac agttttcggg 480
 cggncgancg gcggaccgaa 500

<210> 30
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A010C09 R: the other terminus of DNA fragment A010C09 to A010C09 F.

<400> 30
 tcgatgtcgg ctcttcctat catttgtgaag cagaattcac caagtgttgg attgttcacc 60
 caccaatagg gaacgtgagc tgggtttaga cgtcgtgag acaggtagt tttaccctac 120
 tgatgaccgt gccgcgatag taattcaacc tagtacgaga ggaaccgttg attcacacaa 180
 ttggtcatcg cgcttggttg aaaagccagt ggcgcgaagc taccgtgtgc cggattatga 240
 ctgaacgcct ctaagtcaga atccaagcta gcaagcggcg cctgcgcccg ccgcccggcc 300
 cgaccacgt tagggcgca agccccaaag ggcccgtgcc accggccaag ccggcccggc 360
 cgacgcgccg cggccggccg cctcgaagct cccttccaa cgggcggcgg gctgaatcct 420
 ttgcagacga cttaaatacg cgacggggca ttgtaagtgg cagagtggcc ttgctgccac 480
 gatccactga gatccagccc 500

<210> 31
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A011C02 F: one terminus of DNA fragment A011C02.

<400> 31
 tcgagttagg gatttgattg aagagtcaat catttagcca tgcactcaag tttcaagtta 60
 gagatttgat tgaagagtca atcaatctct aacctgtggg ttaagtagat acatgcccta 120
 taaatatcga tatatttaga aatacggtaa ttaccatatt ataagaaacg gtaatttcca 180
 caagaatacg gtaaatacga aaatgatcgg tacaacagca aaaccatttc cgtttctgtt 240
 tccatatatt ttaccatttc catatttttt ggtcgattat catttccata tagctcgccc 300
 ggttaaaagt aaaaaacgaa cgccagtcgg cggggaatta ccgttaccat tttcacctct 360
 aagccaaaacg atggtggcct tagcatccac agttcaactt ccattctcaa gaaaaaagaa 420
 aaaggattga agcttcatgc cgagtgaac catgggatgc tgtagtaaca cagacgctaa 480
 agatcgcagc attacaaatt 500

<210> 32
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A011C02 R: the other terminus of DNA fragment A011C02 to A011C02 F.

<400> 32
 tcgaaggtagg tgtcaaatta tagccagcca atacatgaac aagttagaaa actgtcaaaa 60
 cccaattcat caatagtga gatttgatgg tggtatatatt ttttccttt tttctgatta 120
 tgacctttta gggttgtaat cttgtaattt ttttctctgg aactttgcac ggttggttaa 180
 aaaaaacagt tgggactttt caagaaaaaa aaaacggccg gagcactgtc aaacgaactc 240
 actaataggc ctgcgaatct tattgggctt ttacgaaca aaggcccata aaatgtagcc 300
 catttaggcc caaactgtac atcaccgtg attaaacggc ccagcccaaa catcataaca 360
 ctggataggg tgcagacaag ggtcccaccc gtcagatccc gacacgtcat cattgccgat 420

ccgcttccag aagcagcggc aagtttccat ctcttcttcc cccttggctt tttatcgctc
gatcaggtag cagcgacaac

480
500

<210> 33
<211> 500
<212> DNA
<213> Oryza rufipogon

<220>
<223> A010B03 F: one terminus of DNA fragment A010B03.

<400> 33
tcgaacagcc gactcagaac tggtagcgac aagggggaatc cgactgttta attaaaacaa 60
agcattgcga tggctcctgc ggatgctgac gcaatgtgat ttctgcccag tgctctgaat 120
gtcaaagtga agaaattcaa ccaagcgcgg gtaaacggcg ggagtaacta tgactctctt 180
aaggtagcca aatgcctcgt catctaatta gtgacgcgca tgaatggatt aacgagattc 240
ccactgtccc tgtctactat ccagcgaaac cacagccaag ggaacgggct tggcgggaatc 300
agcgggggaaa gaagaccctg ttgagcttga ctctagtccg actttgtgaa atgacttgag 360
aggtgtagga taagtgggag ccctcgggag caagtgaaat accactactt ttaacgttat 420
tttacttatt ccgtgagtcg gaagcggggc ctggcccctc cttttggctc taaggcccga 480
gtccctcggg ccgatccggg 500

<210> 34
<211> 500
<212> DNA
<213> Oryza rufipogon

<220>
<223> A010B03 R: the other terminus of DNA fragment A010B03 to A010B03 F.

<400> 34
tcgaaggatc aaaaagcaac gtcgctatga acgcttggct gccacaagcc agttatccct 60
gtggtaactt ttctgacacc tctagcttca aactccgaag gtctaaagga tcgataggcc 120
acgctttcac gggttcgtatt cgtactggaa atcagaatca aacgagcttt tacccttttg 180
ttccacacga gatttctgtt ctcgttgagc tcattcttagg acacctgcgt tatcttttaa 240
cagatgtgcc gccccagcca aactccccac ctgacaatgt cttccgcccg gatcgccccg 300
agggactcgg gccttagagc caaaaggagg ggccaggccc cgcttccgac tcacggaata 360
agtaaaataa cgttaaaagt agtggtatct cacttgcgcc cgagggtccc cacttatcct 420
acaccttca agtcatttca caaagtcgga ctagagtcaa gctcaacagg gtcttcttcc 480
cccgtgatt ccgccaagcc 500

<210> 35
<211> 500
<212> DNA
<213> Oryza rufipogon

<220>
<223> A009F06 F: one terminus of DNA fragment A009F06.

<400> 35

tcgagtttga ttcggattcg tttttcccg aagtttcctt ctgcccgcg gtcgccgtgg	60
gcctccgtcg ccgcttgcta gcccctttat aaggatcccc ggtgtctcct ctacccgccg	120
ccaccctcgc cttcgctctt cgccgccgcc agagccctag cgccgtgcaa cttgcgccg	180
ccgtcgccgc cgtcgctcca atcgtgcgcc gccgtcgctc cagccgtcgc cgtcgctcgg	240
gaagaccgtc atcgtggctg ccgtcgcgct gccgtcctcg tccgccccct cgccgtcgcc	300
ggagatcgcc ggagcgctat cgccgccgtc gacccgaaga gtttcgccgt ttcctcctcg	360
tcgccgtcac cgtccgttgc ctctccgccg tcgctttggt cgtcggtgag ttcgccgtgc	420
cgtccgctac ccgttgggtc cttccgtttg cgtcctcgcg ccgccgcccg agccgtccgc	480
tccgccgagc cgccgccgcc	500

<210> 36
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A009F06 R: the other terminus of DNA fragment A009F06 to A009F06 F.

<400> 36	
tcgaatagcc gtgcccgcgg ttatgggcgg gtctaacaat gtctttcgtg attagtctca	60
cccttctcac catagtaaata gatgctataa ttggtaataa ttgattagc tcctggtttg	120
gaatggaata ttcctggttt ggagatagaa ctgtgcagcc gggatggttg ttcagattgg	180
ttgggcctat acaacagggg atgttgtata gcgttggatt aatactgctt aattaatatt	240
taactgtttt aaattctcaa atgtttgcta aatgctgctt ttgcaaatgg agccctatta	300
tgccatcctt tgttatcctg tgcacttgca tatttgctgc gtggcttgct gagtatgtca	360
tatactcacc ttgcaatcat tcattcagag gaagagttct tcagtgaagc tgatgggtgtg	420
gaggattagg tgtagccttg gtcaagctgc ctgtggagtg gagccgtcta cgctgtttat	480
tttattttcc gctgcttaga	500

<210> 37
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A009E11 F: one terminus of DNA fragment A009E11.

<400> 37	
tcgagttgga gcacgcctgt cgggaccgga aagatggtga actatgcctg agcggggcga	60
agccagagga aactctggtg gaggctcgaa gcgatactga cgtgcaaatc gttcgtctga	120
cttgggtata ggggcgaaag actaatcgaa ccatctagta gctggttccc tccgaagttt	180
ccctcaggat agctggagcc cattacgagt tctatcgggt aaagccaatg attagaggca	240
tcggggggcgc aacgccctcg acctattctc aaactttaaa taggtaggac ggcgcggctg	300
ctccggtgag ccgcgccacg gaatcgggag ctccaagtgg gccatttttg gtaagcagaa	360
ctggcgatgc gggatgaacc ggaagcctgg ttacgggtgcc gaactgcgcg ctaacctaga	420
accacaaaag ggtgttggtc gattaagaca gcaggacggt ggtcatggaa gtcgaaatcc	480
gctaaggagt gtgtaacaac	500

<210> 38
 <211> 500

<212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A009E11 R: the other terminus of DNA fragment A009E11 to A009E11 F.

<400> 38
 tcgaggcggc cggccgcggc gcgtcggccg ggccggcttg gccggtggca cgggcccttg 60
 ggggcttgcg cccctaacgt gggtcggggc gggcggcggg cgcaggcgcc gcttgctagc 120
 ttggattctg acttagaggc gttagtcac aatccggcac acggtagctt cgcgccactg 180
 gcttttcaac caagcgcgat gaccaattgt gtgaatcaac gggtcctctc gtactagggt 240
 gaattactat cgcggcacgg tcatcagtag ggtaaaacta acctgtctca cgacgggtcta 300
 aaccagctc acgttcccta ttggtgggtg aacaatccaa cacttgggtga attctgcttc 360
 acaatgatag gaagagccga catcgaagga tcaaaaagca acgtcgctat gaacgcttgg 420
 ctgccacaag ccagttatcc ctgtggtaac tttctgaca cctctagctt caaactccga 480
 aggtctaaag gatcgatagg 500

<210> 39
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A008B02 F: one terminus of DNA fragment A008B02.

<400> 39
 tcatatatta attctctctc tctaaaaata taaaaaaaag gagtctgcmc accgagatct 60
 gccataaaaag gtccaagcca taacaagtga gaagctatac ggctcaattc taacataatt 120
 accctaatat agctggctct ttgggggtatt tgaatattct ccaagaattc tggtgcattt 180
 accgttattg cttctgtaaa catagtagct aaataatccc aacgtgttac ataaggtaag 240
 tattgtataa tagttcggtt ttccgcgatt ttttccattc ctctgtgtaa atagcctaatt 300
 atgggttcac aatcaataac atcttcacca tcgagagtaa cgatcagtcg aagaacacca 360
 tgcattgatg ggtgctgagg gcccatattg actatcatga 400

<210> 40
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>
 <223> A008B02 R: the other terminus of DNA fragment A008B02 to A008B02 F.

<400> 40
 tcgaagacgc ggaatggtag tgaatagaga gaaagattct tctggttttc ttgttcctga 60
 aatatattcta tctatctcct agacgccgta gagaattgag aattttcatg tctttcaatt 120
 ctcgtactcg taattggaaa gttacgggaag gagatccatc attttgcaat gaaaactaca 180
 taaaaaactc tggacaattt cgaaatcagg ccaagcgtct taatacatat gcaaaaaaat 240
 tcattattgg cccaccattg attagaagat ttaacttgta tgaatcgcta ttggtttgat 300
 acgaataatg gcagttgttt cagtatgta aggatacaga tgtatccaca attcatttag 360
 agttacttaa tagcctatct cttataccat atctctatcc 400

<210> 41
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A083G04 F: one terminus of DNA fragment A083G04.

<400> 41
 tcgatggtag gataggggcc taccatggtg gtgacgggtg acggagaatt agggttcgat 60
 tccggagagg gagcctgaga aacggctacc acatccaagg aaggcagcag gcgcgcaa 120
 tacccaatcc tgacacgggg aggtagtac aataaataac aataccgggc gctttagtgt 180
 ctggttaattg gaatgagtac aatctaaatc ccttaacgag gatccattgg agggcaagtc 240
 tgggtgccagc agccgcggta attccagctc caatagcgta tatttaagtt gttgcagtta 300
 aaaagctcgt agttggacct tgggccgggc cggccggtcc gcctcacggc gagcaccgac 360
 ctgctcgacc cttctgccgg cgatgcgctc ctggccttaa 400

<210> 42
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A083G04 R: the other terminus of DNA fragment A083G04 to A083G04 F.

<400> 42
 tcgagttatc atgaatcatc ggatcagcgg gcggagcccg cgtcagcctt ttatctaata 60
 aatgcgcccc tcccggaagt cggggtttgt tgcacgtatt agctctagaa ttactacggt 120
 tatccgagta gcacgtacca tcaaacaac tataactgat ttaatgagcc attcgcagtt 180
 tcacagttcg aattagttca tacttgcaca tgcatggctt aatctttgag acaagcatat 240
 gactactggc aggatcaacc aggtagcacg tcctccgcga cgagcccgcg ccgtccgacg 300
 cgcgtcgccg ccgcccccg gtcgggagcg gcggacacgg cggcggcccg gcgggctgtc 360

<210> 43
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A088E02 F: one terminus of DNA fragment A088E02.

<400> 43
 tcgagcctcc accagagttt cctctggctt cgccccgctc aggcatagtt caccatcttt 60
 cgggtcccga caggcgtgct ccaactcgaa cccttcacag aagatcaggg tcggccagcg 120
 gtgcggcccg tgaggcctc ccgctcgtca gcttccttgc gcatcccagg tttcagaacc 180
 cgctgactcg cacgcatgtc agactccttg gtccgtgttt caagacgggt cggatgggga 240
 gccgcaggc cgttgcagcg cagcgccccg aggggcgcgc cagaggcgcg cggtgaccgg 300
 ctgcgccgac gacggctgcc gggggcgcgagg agccccggg ctttggccgc cggcgcgggc 360
 gacaacggtc cacgccccga gccgatcggc ggaccagccg 400

<210> 44
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A088E02 R: the other terminus of DNA fragment A088E02 to A088E02 F.

<400> 44
 tccaggcgtg gagcctgcgg ctttaatttga ctcaacacgg ggaaacttac cagggtccaga 60
 catagcaagg attgacagac tgagagctct ttcttgattc tatgggtggg ggtgcatggc 120
 cgtttcttagt tggaggagcg atttgtctgg ttaattccgt taacgaacga gacctcagcc 180
 tactaactag ctatgcggag ccatccctcc gcagctagct tcttagaggg actatggccg 240
 tttaggccac ggaagtttga ggcaataaca ggtctgtgat gcccttagat gttctgggcc 300
 gcacgcgcgc tacactgatg tattcaacga gtatatagcc ttggccgaca ggcccgggta 360
 atcttgggaa atttcacgt gatggggata gatcattgca 400

<210> 45
 <211> 400
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A089F12 F: one terminus of DNA fragment A089F12.

<400> 45
 tcgagcagtc cgccggcagc cgacgggttc ggggccggga ccccgagcc cagccctcag 60
 agccaatcct ttccccgaag ttacggatcc gttttgccga cttcccttgc ctacattgtt 120
 ccattggcca gaggtgttcc accttggaga cctgatgcgg ttatgagtac gaccgggcgt 180
 ggacgggtact cggctcctccg gatcttcaag ggccgcccgg ggccgaccgg acaccgcgcg 240
 acgtgcggtg ctcttccggc cgctggaccc tacctccggc tgaaccgttt ccagggttgg 300
 cgggccgtta agcagaaaag ataactcttc ccgaggcccc cgccggcgtc tccggacttc 360
 ctaacgtcgc cgtcaaccgc cacgtcccgg ctccggaaat 400

<210> 46
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Oryza rufipogon

<220>

<223> A089F12 R: the other terminus of DNA fragment A089F12 to A089F12 F.

<400> 46
 tcgaacagcc gactcagaac tggtagcgac aagggggaatc cgactgttta attaaaacaa 60
 agcattgcga tggctctcgc ggatgctgac gcaatgtgat ttctgcccag tgctctgaat 120
 gtcaaagtga agaaattcaa ccaagcgccg gtaaacggcg ggagtaacta tgactctctt 180
 aaggtagcca aatgcctcgt catctaatta gtgacgcgca tgaatggatt aacgagattc 240
 ccactgtccc tgtctactat ccagcgaaac cacagccaag ggaacgggct tggcggaatc 300
 agcgggggaaa gaagaccctg ttgagcttga ctctagtccg actttgtgaa atgacttgag 360

<210> 47
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A029B04 F.

<400> 47
tcgaatttga ccatgagata caga 24

<210> 48
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A029B04 F.

<400> 48
aagaaaaaaaa tgcttgtgta ctga 24

<210> 49
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A029B04 R.

<400> 49
tcgagctaataaactagcca agtg 24

<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A029B04 R.

<400> 50
aagtaacatg agaaaaaaaa acat 24

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A028C04 F.

<400> 51

tcgattaaga cagcaggacg gtgg

24

<210> 52

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A028C04 F.

<400> 52

gcaagtgccg ttcacatgga acct

24

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A028C04 R.

<400> 53

tcgagggcgt tgcgcccccg atgc

24

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A028C04 R.

<400> 54

ccgtcttgaa acacggacca agga

24

<210> 55

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A048F12 F.

<400> 55

tcgatgtagt cctcctcgag gccg

24

<210> 56
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A048F12 F.

<400> 56
caacaaccga gcaatacagt tcaa 24

<210> 57
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A048F12 R.

<400> 57
tcgagtggtc ggcgtccccc ggcc 24

<210> 58
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A048F12 R.

<400> 58
ccggagttca ccatgccccg gggc 24

<210> 59
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049A01 F.

<400> 59
tcgaactaac gctaacaacg tgca 24

<210> 60
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049A01 F.

<400> 60
atttggcgca tctgaacact gaac 24

<210> 61
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049A01 R.

<400> 61
tcgagtgccca tcctcttctc aatg 24

<210> 62
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049A01 R.

<400> 62
gtttttgttc gttacaatga gaac 24

<210> 63
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A046A06 F.

<400> 63
tcgaactacc gagctcccc taat 24

<210> 64
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A046A06 F.

<400> 64
gtagctgaaa ggcgtaaccg tacc 24

<210> 65

<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A046A06 R.

<400> 65
tcgaacttgt cttccaattt gcgt 24

<210> 66
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A046A06 R.

<400> 66
aaccgccgaac ttcaatcaag tccc 24

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A045B09 F.

<400> 67
tcgacgacga cgcggcgaag ccga 24

<210> 68
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A045B09 F.

<400> 68
ccgccgcatc ccgccgtccc cgcg 24

<210> 69
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A045B09 R.

<400> 69
tcgaggatgc ctgtggagtg gtgt

24

<210> 70
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A045B09 R.

<400> 70
ccgtggaccg ccgcttcgtt tccc

24

<210> 71
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049A07 F.

<400> 71
tcgagcagtc cgccggcagc cgac

24

<210> 72
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049A07 F.

<400> 72
atttcccag cggggacgtg gcgg

24

<210> 73
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049A07 R.

<400> 73
tcgaaccatc tagtagctgg ttcc

24

<210> 74
<211> 24

<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049A07 R.

<400> 74
gcttcagcgc catccatttt cggg 24

<210> 75
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A040D06 F.

<400> 75
tcgacgggtt ctgaaacctg ggat 24

<210> 76
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A040D06 F.

<400> 76
gagcagccgc gccgtcctac ctat 24

<210> 77
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A040D06 R.

<400> 77
tcgagccccc aactttcggtt cttg 24

<210> 78
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A040D06 R.

<400> 78
agcgtatatt taagttgttg cagt

24

<210> 79
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A036A03 F.

<400> 79
tcgaaaatga ccgtcaacaa aacc

24

<210> 80
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A036A03 F.

<400> 80
atcaaaaagg catcatttgg tgag

24

<210> 81
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A036A03 R.

<400> 81
tcgatgcatt gagcagaaag gaat

24

<210> 82
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A036A03 R.

<400> 82
atattcttcc accaaaaagt atct

24

<210> 83
<211> 24
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A051E08 F.

<400> 83

tcgatgaaga acgtagcgaa atgc

24

<210> 84

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A051E08 F.

<400> 84

atatgcttaa actcagcggg tagt

24

<210> 85

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A051E08 R.

<400> 85

tcgatgcgag agccgagata tccg

24

<210> 86

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A051E08 R

<400> 86

cccgtcgctc ctaccgattg aatg

24

<210> 87

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A023D09 F.

<400> 87

tcgacgccat actgatgagc aatg 24
<210> 88
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A023D09 F.

<400> 88

gttgatgctc ttctctgcgt catc 24

<210> 89

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A023D09 R.

<400> 89

tcgaatgcca gttaaagtga tgcc 24

<210> 90

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A023D09 R.

<400> 90

ctactgcgcc gagcccacgc tgag 24

<210> 91

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A030B02 F.

<400> 91

tcgaagcttc acagttgata act 24

<210> 92

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A030B02 F.

<400> 92
gaggtttcga acccaggttg tcta 24

<210> 93
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A030B02 R.

<400> 93
tcgaggtgaa ctattttttt tctt 24

<210> 94
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A030B02 R.

<400> 94
ggccctcggg gccgaggcgg gagt 24

<210> 95
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A043F04 F.

<400> 95
tcgaccacct tctcagaagc aaaa 24

<210> 96
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A043F04 F.

<400> 96
aacatccaac agattgagac act 24

<210> 97
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A043F04 R.

<400> 97
tcgatagcac cattgggact atac 24

<210> 98
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A043F04 R.

<400> 98
tgattcgaac aaatttaggg tatt 24

<210> 99
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049E02 F.

<400> 99
tcgattaaga cagcaggacg gtgg 24

<210> 100
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049E02 F.

<400> 100
cccggctcgg gaaatcttaa cccg 24

<210> 101
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A049E02 R.

<400> 101
tcgaccgaat cgggttttcg gtcg 24

<210> 102
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A049E02 R.

<400> 102
ggatggccgg gctgccacgc gcac 24

<210> 103
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A010C09 F.

<400> 103
tcgaccgaat cgggttttcg 20

<210> 104
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A010C09 F.

<400> 104
accgaaaact gtgtgcgagc 20

<210> 105
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A010C09 R.

<400> 105
tcgatgtcgg ctcttcctat 20

<210> 106

<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A010C09 R.

<400> 106
gggctggatc tcagtggatc 20

<210> 107
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A011C02 F.

<400> 107
tcgagttagg gatttgattg 20

<210> 108
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A011C02 F.

<400> 108
aatattgtaat gctgcgatct 20

<210> 109
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A011C02 R.

<400> 109
tcgaaggtgg tgtcaaatta 20

<210> 110
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A011C02 R.

<400> 110
gtgtgtcgctg ccacctgatc

20

<210> 111
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A010B03 F.

<400> 111
tcgaacagcc gactcagaac

20

<210> 112
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A010B03 F.

<400> 112
cccggatcgg cccgagggac

20

<210> 113
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A010B03 R.

<400> 113
tcgaaggatc aaaaagcaac

20

<210> 114
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A010B03 R.

<400> 114
ggcttggcgg aatcagcggg

20

<210> 115
<211> 20

<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A009F06 F.

<400> 115
tcgagtttga ttcggattcg 20

<210> 116
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A009F06 F.

<400> 116
ggcggcggcg gctcggcgga 20

<210> 117
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A009F06 R.

<400> 117
tcgaatagcc gtgcccgcgg 20

<210> 118
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A009F06 R.

<400> 118
tctaagcagc ggaaaataaa 20

<210> 119
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A009E11 F.

<400> 119
tcgagttgga gcacgcctgt 20

<210> 120
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A009E11 F.

<400> 120
gttgttacac actccttagc 20

<210> 121
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A009E11 R.

<400> 121
tcgaggcggc cggccgcggc 20

<210> 122
<211> 20
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A009E11 R.

<400> 122
cctatcgatc cttagacct 20

<210> 123
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial sequence

<220>
<223> forward primer for amplifying DNA fragment A008B02 F.

<400> 123
tcatatatta attctctctc tcta 24

<210> 124
<211> 20
<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A008B02 F.

<400> 124

tcatgatagt caatatgggc cctc

24

<210> 125

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A008B02 R.

<400> 125

tcgaagacgc ggaatggtag tgaa

24

<210> 126

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A008B02 R.

<400> 126

ggatagagat atggtataag aaat

24

<210> 127

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A083G04 F.

<400> 127

tcgatggtag gataggggcc tacc

24

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A083G04 F.

<400> 128

ttaaggccag gagcgcatcg ccgg

24

<210> 129

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A083G04 R.

<400> 129

tcgagttatc atgaatcatc ggat

24

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A083G04 R.

<400> 130

gacagcccgcc ccggccgccc ccgt

24

<210> 131

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A088E02 F.

<400> 131

tcgagcctcc accagagttt cctc

24

<210> 132

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A088E02 F.

<400> 132

cggctggtcc gccgatcggc tcgg

24

<210> 133

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A088E02 R.

<400> 133

tccaggcgtg gagcctgcgg ctt

24

<210> 134

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A088E02 R.

<400> 134

tgcaatgatc tatcccatc acga

24

<210> 135

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A089F12 F.

<400> 135

tcgagcagtc cgccggcagc cgac

24

<210> 136

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> reverse primer for amplifying DNA fragment A089F12 F.

<400> 136

atttcccagc ccgggacgtg gcgg

24

<210> 137

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> forward primer for amplifying DNA fragment A089F12 R.

<400> 137

tcgaacagcc gactcagaac tggt

24

<210> 138
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

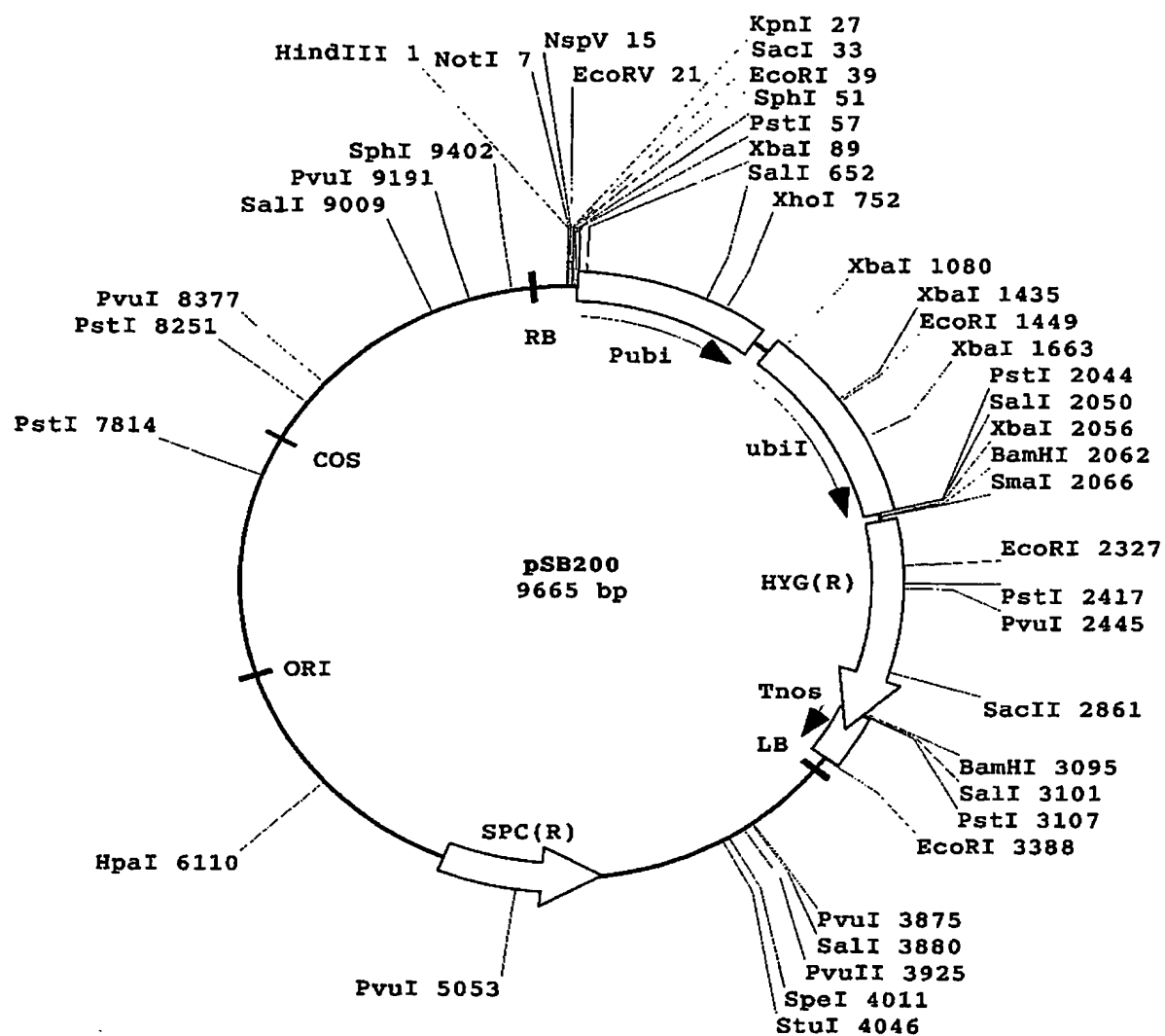
<220>
 <223> reverse primer for amplifying DNA fragment A089F12 R.

<400> 138
 ctcaagtcac ttcacaaagt cgga

24

【書類名】 図面

【図1】

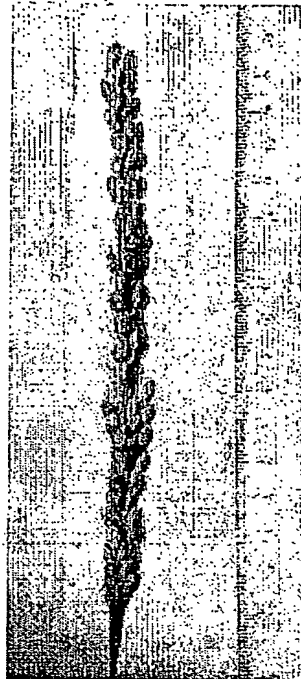


【図 3】

BEST AVAILABLE COPY



ゲノム断片
A083G04
(SEQ ID NO:41
SEQ ID NO:42)
導入植物



ゲノム断片
A088E02
(SEQ ID NO:43
SEQ ID NO:44)
導入植物



ゲノム断片
A089F12
(SEQ ID NO:45
SEQ ID NO:46)
導入植物



対照植物

【書類名】 要約書

【要約】

植物に導入して農業上有益となる植物の改良を行うためのゲノムDNA断片の選抜方法を提供する。

本発明の方法は、(1) 植物からゲノムDNAを調製し、クローニングベクターを用いて、ゲノムDNAライブラリーを構築し；(2) ゲノムDNAライブラリーを構成する複数のゲノムクローンの各々に含まれるゲノム断片を、個別に植物に導入し、形質転換植物を作出し；(3) 形質転換植物、または、その子孫の植物を栽培し、表現型に農業上有益となりうる変異の生じた植物を選抜し；(4) 工程(3) において選抜された植物に、工程(2) において導入されていたゲノムDNA断片を、目的とするゲノムDNA断片として選抜する；工程からなる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 6 4 6 8 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 4 5 6 9]

1. 変更年月日

1 9 9 5 年 5 月 1 6 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都港区虎ノ門二丁目 2 番 1 号

氏 名

日本たばこ産業株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/015743

International filing date: 22 October 2004 (22.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-364682
Filing date: 24 October 2003 (24.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse